

Aus dem Zentrum für Innere Medizin des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Medizinische Klinik I

Prof. Dr. med. Ansgar W. Lohse

**Expression von Somatostatinrezeptoren in
Hepatozellulären Karzinomen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Michael Schmitz

aus Köln

Hamburg

2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in:

Inhaltsverzeichnis

1.	Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2.	Einleitung	3
2.1	Somatostatin	3
2.2	Somatostatinrezeptoren	3
2.3	Somatostatinanaloga	5
2.4	Hepatozelluläres Karzinom	6
2.5	Therapie des HCC	7
2.6	Therapie mit Somatostatinanaloga.....	10
2.7	Somatostatinanaloga in der Therapie des HCC.....	10
2.8	Somatostatinrezeptoren im HCC.....	13
3.	Material und Methoden.....	14
3.1	Materialien und Substanzen.....	14
3.2	Puffer	15
3.3	Untersuchungsmaterial	16
3.4	Pankreasgewebe	17
3.5	Tumorstadium	17
3.6	histologisches Grading	18
3.7	Histologischer Typ.....	19
3.8	Zusätzliche Charakteristika	19
3.9	Anfertigen der Gewebsschnitte	22
3.10	Immunhistochemie	22
3.11	Primärantikörper.....	23
3.12	Antigen-Demaskierung.....	23
3.13	Blockade der endogenen Peroxidase	24
3.14	Durchführung der Immunhistochemie	24
3.15	Positivkontrolle	26
3.16	Negativkontrolle	26
3.17	Spezifitätskontrolle	26
3.18	Präabsorption.....	26
3.19	Auswertung	27
3.20	Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin	27
4.	Ergebnisse	29
4.1	Ergebnis der Immunhistochemie.....	29
4.2	Vergleich mit Klinik und Histopathologie	33
4.3	Positivkontrolle	36
4.4	Negativkontrolle	38
4.5	Präabsorption.....	38
5.	Diskussion	40
5.1	Hepatozelluläre Karzinome zeigen ein differentielles SSTR- Expressionsmuster.....	40
5.2	Immunhistochemie ist eine verlässliche Methode zum SSTR-Nachweis formalinfixierter HCC-Biopsate.....	41
5.3	SSTR vermitteln zytostatische und zytotoxische Effekte.....	43
5.4	Die Expression zellzyklusarrest- und apoptose-vermittelnder SSTR bildet die Rationale einer Tumortherapie mit Somatostatinanaloga.....	46
5.5	Mögliche Verbesserung einer HCC-Therapie durch Somatostatinanaloga mit neuartigem Rezeptorprofil	47

5.6	Bei HCCs ist die SSTR-Expression unabhängig von klinischen und histologischen Parametern.....	48
5.7	Abschlussbemerkung und Ausblick.....	49
6.	Zusammenfassung	51
7.	Abbildungsverzeichnis	52
7.1	Tabellen	52
7.2	Abbildungen	52
8.	Abkürzungsverzeichnis	53
9.	Literaturverzeichnis	54
10.	Lebenslauf	60
11.	Danksagung	61
12.	Eidesstattliche Versicherung	62

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Hepatozelluläre Karzinome (HCC) zählen weltweit zu den malignen Tumoren, die in ihrer Inzidenz am stärksten zunehmen. Der überwiegende Teil der betroffenen Patienten leidet gleichzeitig an einer Leberzirrhose, welche wiederum einen der Hauptrisikofaktoren für das HCC darstellt.

Bei Diagnosestellung liegt das HCC in vielen Fällen bereits in einem inoperablen Tumorstadium vor, so dass alternative therapeutische Konzepte herangezogen werden müssen. Dazu zählen vor allem interventionelle Strategien, wie z. B. Alkohol-Injektion oder die transarterielle Chemoembolisation. Diese Verfahren sind in ihrer Effektivität nicht unumstritten und mit beträchtlichen Komplikationen und Nebenwirkungen behaftet. Rein medikamentöse Strategien wie z. B. verschiedene Protokolle einer systemischen Chemotherapie haben sich als wenig wirksam erwiesen.

Zu den neueren medikamentösen Therapieoptionen zählt das Somatostatinanalogon Octreotid. Neben geringer Nebenwirkungsrate und guter Verträglichkeit wurden in verschiedenen Studien ausgeprägte positive Effekte auf Mortalität und Lebensqualität beim HCC demonstriert. Mehrere Folgestudien zeigten vergleichbare Ergebnisse, andere Studien zeigten keinen signifikanten Effekt. Molekulare Grundlage einer Therapie mit Somatostatinanaloga ist die Expression von Somatostatinrezeptoren (SSTR) im Tumorgewebe. Hierüber war bisher nur sehr wenig bekannt. In eigenen Untersuchungen an wenigen Tumorproben konnte gezeigt werden, dass HCCs ein differentielles individuell-spezifisches Expressionsmuster für die fünf verschiedenen SSTR aufweisen. Verschiedene Subtypen, vor allem SSTR2, SSTR3 und SSTR5 vermitteln antiproliferative Effekte. Somit ist nur bei einem entsprechenden Rezeptorbesatz von einem Effekt einer Therapie mit Somatostatinanaloga auszugehen.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollen 50 HCCs systematisch immunhistochemisch hinsichtlich der Expression der fünf verschiedenen SSTR-Subtypen untersucht werden. Der Rezeptorstatus soll dann mit klinischen und histopathologischen Daten verglichen und korreliert werden. Aus den erarbeiteten Daten kann zum einen die Inzidenz der einzelnen SSTR im HCC bestimmt werden und damit

zum anderen die generelle Wahrscheinlichkeit des Ansprechens für eine Therapie mit Somatostatinanaloga abgeleitet werden. Derartige Daten liegen bislang nicht vor, stellen jedoch eine wichtige Grundlage für das Verständnis der Therapie und für die Therapieentscheidung dar.

2. Einleitung

2.1 Somatostatin

Somatostatin (SST) ist ein zyklisches Peptidhormon. 1973 wurde es erstmalig aus dem Hypothalamus isoliert und nachgewiesen, dass es die Ausschüttung von Wachstumshormon (GH) hemmt [1]. Zwei Formen sind bekannt. SST-14 und das am N-Terminus verlängerte SST-28, die aus einem gemeinsamen Vorläufer (proSST) durch unterschiedliches posttranslationales Prozessing gebildet werden [2]. SST-synthetisierende Zellen finden sich fast allen Organen. In besonders hoher Konzentration kommt es im ZNS und peripheren Nervensystem, dem Gastrointestinaltrakt und im endokrinen Pankreas vor. Daneben lässt sich Somatostatin auch in verschiedenen Zellen des Immunsystems und in Tumorzellen nachweisen [3].

Im Gastrointestinaltrakt ist Somatostatin ein potenter Inhibitor der neuroendokrinen Hormonsekretion und der exokrinen Sekretion von Speicheldrüsen, Magen, Dünndarm, Pankreas und Leber. Es vermindert zudem die motorische Aktivität von Magen, Gallenblase und Darm. Im Gehirn wirkt es als Neurotransmitter mit vielfältigen Funktionen und hemmt die Freisetzung von Dopamin, TRH, CRH, GH und TSH. Zusätzliche inhibitorische Wirkung besitzt es auf Schilddrüse, Nebennieren und Nieren [4, 5]. SST wirkt vasokonstriktorisch [6] und hemmt die Proliferation von Lymphozyten und anderen Entzündungszellen [7].

Zusammengefasst lässt sich Somatostatin als ein inhibitorisches Peptidhormon mit exokriner, endokriner, parakriner und autokriner Aktivität charakterisieren [8].

2.2 Somatostatinrezeptoren

Die physiologischen und therapeutischen Effekte von SST werden durch spezifische Rezeptoren vermittelt. Bislang wurden fünf Somatostatinrezeptor-(SSTR)-Subtypen 1-5 kloniert und näher charakterisiert [3, 9]. Jeder Subtyp wird auf einem unterschiedlichen Chromosom kodiert. Das Molekulargewicht liegt zwischen 39 und 45 kD und die Anzahl der Aminosäuren schwankt zwischen 364 und 418. Alle fünf Subtypen weisen den typischen Aufbau G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

auf und verfügen über sieben Transmembrandomänen. Das N-terminale Segment befindet sich extrazellulär und ist verantwortlich für die Erkennung und Bindung des Liganden, während der intrazellulär gelegene C-Terminus die Signalweiterleitung ins Zellinnere vermittelt [4]. Die Sequenzhomologie zwischen den fünf Subtypen untereinander beträgt mindestens 42 %. Somit bilden die SSTRs eine eigene Untergruppe in der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren [8]. Beim Vergleich der Aminosäuresequenz mit anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zeigt sich eine Verwandtschaft zu den Opiatrezeptoren. Die Sequenzhomologie zwischen dem Δ -Subtyp und SSTR1 beträgt 37 % [10]. Keine wesentliche Ähnlichkeit besteht mit Rezeptoren anderer Peptidhormone wie Glukagon, GIP, VIP und Sekretin [5]. Eine Übersicht über Charakteristika der humanen SSTR gibt Tabelle 2-1.

Der SSTR2-Rezeptor liegt in zwei Formen vor, die durch alternatives Splicing der SSTR2-mRNA gebildet werden. Die lange (SSTR2A) und die kurze (SSTR2B) Variante unterscheiden sich in der Länge des intrazellulären C-Terminus und setzen sich aus 369 bzw. 346 Aminosäureresten zusammen [11].

SSTR wurden mit einer Reihe von Verfahren wie Rezeptor-Autoradiographie, RT-PCR, In-situ-Hybridisierung und, seit der Entwicklung subtypspezifischer Antikörper, mittels Immunhistochemie in normalem Gewebe, Tumoren und Tumorzelllinien nachgewiesen. Hierbei zeigten sich variable, aber gewebsspezifische Expressionsmuster. Im menschlichen Gehirn konnten beispielsweise alle fünf SSTR nachgewiesen werden, während in Tumoren SSTR2 der dominierende Subtyp zu sein scheint, SSTR4 hingegen eher selten oder nicht exprimiert wird [4, 13, 14]. Inselzellen des menschlichen Pankreas exprimieren alle fünf SSTR mit variablem Expressionsmuster in der Rangordnung SSTR1>SSTR5>SSTR2>SSTR3>SSTR4 [15].

Tabelle 2-1: Strukturelle Daten der fünf humanen SSTR (modifiziert nach [4, 5]). + Stimulation, - Inhibition.

SSTR	1	2	3	4	5
Chromosomale Lokalisation	14	17	22	20	16
Anzahl der Aminosäuren	391	369A/ 346B	418	388	364
Molekulargewicht des Proteins (kDa)	42	41	45	42	39
Sequenzhomologie der Proteine (%)					
SSTR1		46	43	60	45
SSTR2A			46	43	52
SSTR3				42	53
SSTR4					49

2.3 Somatostatinanaloga

Die fünf SSTR-Subtypen binden SST-14 und SST-28 mit nanomolarer Affinität, wobei SST-14 eine höhere Bindungsselektivität für SSTR1-4 aufweist, SST-28 im Vergleich zu SST-14 aber eine 10- bis 15-fache Selektivität für SSTR5 besitzt [16]. Die Wirkung von endogenem Somatostatin ist weitgehend spezifisch, da es hauptsächlich lokal vor Ort synthetisiert und anschließend schnell durch Peptidasen im Gewebe und im Blut inaktiviert wird. Hierdurch werden unerwünschte systemische Effekte verhindert [4]. Die klinische Anwendbarkeit von Somatostatin dagegen wird geschmälert durch die kurze systemische Halbwertszeit von weniger als drei Minuten [17], der Notwendigkeit zur intravenösen Applikation und anschließender Hypersekretion von Hormonen wie Wachstumshormon, Insulin und Glukagon, aufgrund eines Rebound-Effektes [18]. Dies führte zur Suche nach Somatostatinanaloga mit längerer Halbwertszeit und selektiver Rezeptorsubtypspezifischer Wirkung. Das zyklische Peptidhormon Somatostatin bildet mit seinen Aminosäureresten Phe7, Trp8, Lys9 und Thr10 eine β -Schleife, die für die Ligand-Rezeptor-Interaktion entscheidend ist. Trp8 und Lys9 sind hierbei essentielle Komponenten, die den konservierten Kern aller Somatostatinanaloga darstellen, um den sich unterschiedliche Reste gruppieren. Als erster Wirkstoff kam 1983 Octreotid für die Behandlung hormonproduzierender Tumoren von Nebenniere, Pankreas und Gastrointestinaltrakt zur klinischen Anwendung [18, 19]. Die derzeit verfügbaren Somatostatinanaloga wie Octreotid besitzen eine hohe Bindungsaffi-

nität zu SSTR2 und in abnehmendem Masse zu SSTR5 und SSTR3, aber keine Affinität zu SSTR1 und SSTR4 [16]. Lanreotid und Valpreotid sind weitere Somatostatinanaloga mit ähnlichen Bindungseigenschaften wie Octreotid. Octreotid und andere Somatostatinanaloga stehen als Depotpräparate (Octreotid LAR, Lanreotid LAR; LAR=long-acting release) zur Verfügung, bei denen die Wirksubstanz auf Kunststoffpartikel aufgezogen ist [20-22]. Bei intramuskulärer Injektion lässt sich eine Wirkdauer von drei bis vier Wochen mit Octreotid LAR erzielen.

2.4 Hepatozelluläres Karzinom

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) zählt weltweit zu den häufigsten malignen Tumoren und ist für etwa 6% aller Krebserkrankungen beim Menschen verantwortlich. Pro Jahr rechnet man mit dem Neuauftreten von etwa einer halben Million Krankheitsfällen [23]. Die Inzidenzrate ist regional sehr unterschiedlich. Etwa 80% aller Erkrankungen treten in Entwicklungsländern auf, vor allem in Südostasien und den Sub-Sahara-Staaten. Deutschland und die westlichen Industrienationen zählen zu den Gebieten mit niedriger Inzidenz [24]. Epidemiologische Daten deuten aber auf ein Ansteigen der Rate der Neuerkrankungen in diesen Ländern hin [23, 25].

Hepatozelluläre Karzinome machen 80-90 % der primären Leberzellkarzinome aus. In etwa 80 % der Fälle entsteht das HCC auf dem Boden einer Leberzirrhose, die als Präkanzerose angesehen wird [26]. Abhängig von der Genese der Zirrhose variiert das Risiko ein HCC zu entwickeln.

Die Infektion mit dem Hepatitis-B- und dem Hepatitis-C-Virus, sowie chronischer Alkoholabusus sind weltweit betrachtet die Hauptrisikofaktoren für die Entstehung eines HCC. Seltener Ursachen sind Stoffwechselerkrankungen wie Hämochromatose und Porphyrien, sowie die Nahrungskontamination mit Aflatoxin B [25]. Die chronische Hepatitis-B-Infektion ist, weltweit betrachtet, die häufigste der Entwicklung eines HCC zugrundeliegende Ursache. Vor allem in Ländern mit hoher HCC-Inzidenz besteht eine deutliche positive Korrelation zwischen Inzidenzrate und Hepatitis-B-Prävalenz [27]. Für die Hepatitis-C-Infektion erbrachte die Metaanalyse von 21 Fallkontrollstudien, ein 17-fach erhöhtes Risiko für Hepatitis-C-Träger an einem HCC zu erkranken [28]. Gegenüber den viralen Hepatitiden besitzt die

Hämochromatose eine deutlich geringere Prävalenz, doch ist hier das HCC-Risiko 90-200-fach erhöht und etwa 10 % der Hämochromatose-Patienten entwickeln ein HCC im Erkrankungsverlauf [29].

Einen Sonderfall unter den HCC stellt das fibrolamelläre Karzinom dar. Dieser Tumortyp findet sich bei jüngeren Patienten beiderlei Geschlechts und ist gekennzeichnet durch große, eosinophile Hepatozyten mit hyalinen intrazytoplasmatischen Einschlüssen. Zwischen den neoplastischen Leberzellen liegen lamellär angeordnete Bindegewebsstränge. Die Prognose und die Operabilität sind gegenüber den übrigen HCC weitaus günstiger [30].

Epidemiologische Daten aus den Vereinigten Staaten zeigen, dass die 5-Jahresüberlebensrate beim HCC trotz aller therapeutischen Bemühungen bei 6 % liegt. Das HCC wird im allgemeinen in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert, was den Einsatz von chirurgischen und damit kurativen Therapieverfahren erschwert. Nur etwa 8 % der Betroffenen werden überhaupt einer chirurgischen oder lokal invasiven Maßnahme zugeführt und in weniger als 1 % der Fälle wird eine Leberteileresektion oder –transplantation durchgeführt [23, 31].

2.5 Therapie des HCC

Einen kurativen Therapieansatz mit der Möglichkeit des langfristigen und tumorfreien Überlebens bieten die Lebertransplantation und die Leberteileresektion. Die Lebertransplantation ist theoretisch die beste Therapieoption, da der Tumor als Ganzes entfernt und die Leberfunktion wiederhergestellt wird. Kontraindiziert ist die Lebertransplantation bei extrahepatischer Tumormanifestation, großen oder multiplen Tumoren [32]. Der Mangel an Spenderorganen und die damit verbundenen langen Wartezeiten schränken die Anwendung weiter ein. Figueras et al. berichten über 5- und 10-Jahres-Überlebensraten von 68 % bzw. 42 % [33]. Patienten ohne Leberzirrhose mit chirurgisch resezierbaren Tumoren ohne Nachweis von Gefäßeinbruch und Fernmetastasierung sind Kandidaten für eine Leberteileresektion [32]. Dies trifft allerdings nur auf etwa 5 % der Patienten mit HCC zu [34]. In einer Studie, die 133 Patienten mit HCCs > 5cm umfasste, berichten Hanazaki et al. über 3- und 5-Jahres-Überlebensraten von 38 % und 28 % [35].

Ein großer Teil der Tumoren wächst allerdings über lange Zeit asymptomatisch und wird erst in einem späten Stadium diagnostiziert [36]. Häufig ist der Lokalbefund bereits sehr ausgedehnt, oder zum Diagnosezeitpunkt bestehen bereits Fernmetastasen. Metastasen sind häufig in Lymphknoten (42 %), den Lungen (18 %) und im Skelett (17 %) zu finden [37]. Eine eingeschränkte Leberfunktion kann eine Kontraindikation für invasivere Therapien darstellen. Palliative interventionelle Behandlungsansätze haben zum Ziel, durch thermische oder chemische Verfahren eine lokale Tumornekrose zu erreichen. Hierunter fallen die perkutane Ethanolinjektion (PEI), Radiofrequenzthermoablation (RFTA) und transarterielle Chemoembolisation (TACE).

Bei der perkutanen Ethanolinjektion wird 96 %-iger Alkohol unter CT- oder Ultraschallkontrolle in den Tumor appliziert. In mehreren Sitzungen werden jeweils 8-10 ml Alkohol injiziert. Sie eignet sich zur Behandlung kleinerer, auch multilokulärer Tumore. In einer italienischen Studie [38] wurden 184 Patienten mit HCC und Leberzirrhose mit PEI behandelt. Alle Patienten hatten entweder einen solitären Tumor mit 3,1-5 cm Durchmesser oder multiple, maximal vier Knoten mit einem Durchmesser ≤ 3 cm. Die 3-, 5- und 7-Jahres-Überlebensraten lagen jeweils bei 67 %, 41 % und 19 %.

Ein neueres Verfahren ist die Radiofrequenzthermoablation. Eine Sonde wird perkutan unter radiologischer Kontrolle in den Tumor eingeführt. Durch einen angelegten hochfrequenten Wechselstrom werden Temperaturen von annähernd 100 °C in der Umgebung der Sonde erreicht, die zu einer thermischen Nekrose des Tumors führen. Tumore bis zu einer Größe von 5 cm können so behandelt werden. Im Gegensatz zur PEI sind nur ein bis zwei Sitzungen erforderlich. In einer 2003 erschienenen Arbeit [39] wurde die Effizienz der RFTA bei 52 Patienten in einer randomisierten Studie gegenüber der PEI untersucht. Die 1- und 2-Jahresüberlebensraten waren mit 100 % bzw. 98 % besser als bei der PEI (96 % bzw. 88 %).

Sowohl die PEI, als auch die RFTA weisen das Risiko einer Tumorausbreitung im Nadelstichkanal auf. Llovet et al. konnten bei Patienten, die mit RFTA behandelt wurden, Stichkanal-Metastasen histologisch in 12,5 % der Fälle innerhalb eines Zeitraums

mes von 4 bis 18 Monaten nachweisen [40]. Andere Studien konnten dies nicht bestätigen.

Einen anderen Ansatz als die perkutanen Verfahren besitzt die transarterielle Chemoembolisation. Unter röntgenologischer Kontrolle erfolgt die selektive Sondierung einer tumorversorgenden Arterie. Nach Injektion eines Zytostatikums wird das Gefäß embolisiert und auf diesem Wege eine Tumornekrose erzielt. Lokal lassen sich mit dieser Technik hohe Chemotherapeutika-Konzentrationen erzielen. Durch den ausgeprägten hepatischen First-Pass-Effekt werden systemische Nebenwirkungen minimiert. In einer 2003 erschienenen chinesischen Arbeit, die 96 Patienten mit nichtresektablem HCC und noch guter Leberfunktion umfasste, konnte für die mit TACE behandelte Gruppe eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit gegenüber der konservativ behandelten Gruppe (31,2 Monate vs. 14,1 Monate) gezeigt werden [41].

Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit palliativer systemischer Therapie (siehe Tabelle 2-2). Die Verwendung einer ganzen Reihe von Substanzen wie Interferon (alleine oder als Kombinationstherapie), Tamoxifen, Megestrol sowie verschiedener Chemotherapieprotokolle erbrachte enttäuschende Resultate. Die Ansprechraten waren niedrig und nur in seltenen Fällen ließ sich eine Verlängerung der Überlebenszeit nachweisen. Ein zusätzlicher Nachteil war die oft erhebliche Toxizität der eingesetzten Therapieregime [36].

Tabelle 2-2: Mittlere Überlebenszeit bei Anwendung verschiedener systemischer Therapien (übernommen aus [36]).

	Mittlere Überlebenszeit (Spannbreite) in Monate
IFN Monotherapie	3-4
IFN + Chemotherapie	5-10
Monochemotherapie	4-10
Polychemotherapie	8-10
Tamoxifen	3-6
Megestrol	4-18
Octreotid	4-13

2.6 Therapie mit Somatostatinanaloga

Ein weiterer Ansatz im Bereich der systemisch-medikamentösen Therapien zur Behandlung des nichtresektablen HCC ist der Einsatz von Somatostatinanaloga. Somatostatinanaloga, vor allem Octreotid, haben schon vor geraumer Zeit Einlass in die Tumorthherapie gefunden [18, 19, 42]. Eine Reihe von Studien zeigte ihren Stellenwert in der Therapie symptomatischer, funktioneller Tumore zur Kontrolle der überschüssigen Ausschüttung von Hormonen und Sekreten bei Akromegalie, Insulinom, VIPom, Glukagonom und Karzinoiden. Experimentell konnte in verschiedenen Tumormodellen ebenfalls eine antiproliferative Wirkung bei Tumoren von Mamma, Prostata, Kolon, Pankreas und dem kleinzelligen Bronchialkarzinom nachgewiesen werden [8, 43]. Somatostatinanaloga besitzen eine große therapeutische Breite und sind gut verträglich. Über Nebenwirkungen klagen 34 % der behandelten Patienten. Diese sind allerdings in über 90 % mild und ohne klinische Relevanz [44] und umfassen zumeist gastrointestinale Beschwerden wie Übelkeit, Flatulenz, Diarrhöe, Obstipation und Steatorrhöe [36, 45], die in den meisten Fällen innerhalb von 10 bis 14 Tagen wohl aufgrund lokaler Adaptationsmechanismen abklingen [46]. Selten treten Cholelithiasis oder reversible Leberfunktionsstörungen auf [44].

2.7 Somatostatinanaloga in der Therapie des HCC

In der Literatur veröffentlichte Einzelfallbeschreibungen berichten vom erfolgreichen Einsatz von Somatostatinanaloga in der Therapie des HCC [47]. In einer 1998 von Kouroumalis et al. veröffentlichten, randomisiert-kontrollierten Studie wurden 58 Patienten mit fortgeschrittenem HCC eingeschlossen [48]. Die erste Gruppe erhielt zweimal täglich 250 µg Octreotid s. c., während in der Kontrollgruppe keine Therapie durchgeführt wurde. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wiesen die Patienten der Behandlungsgruppe eine erhöhte mittlere Überlebenszeit (13 gegenüber 4 Monaten) und eine erhöhte kumulative Überlebensrate nach 6 und 12 Monaten (75 % gegenüber 37 %, bzw. 56 % gegenüber 13 %) auf. Zusätzlich verbesserte sich die Lebensqualität. Wohlbefinden, Appetit und Körpergewicht stiegen in 54 %, 85 % und 43 % der Fälle an. In der Kontrollgruppe kam es zu keinen Verbesserungen.

Einige der fünf bislang veröffentlichten Folgestudien kamen zu ähnlichen Ergebnissen in Hinblick auf Mortalität und Verbesserung der Lebensqualität, während sich in anderen Studien keine signifikanten Effekte nachweisen ließen (vgl. Tabelle 2-3).

Tabelle 2-3: Studienlage zur Therapie mit Somatostatinanaloga bei HCC [48-53].

Studie	Design	Patienten ¹	Überlebensrate	Tumorwachstum	Lebensqualität (QOL)
Kouroumalis et al. (1998)	randomisiert ²	29	+	-	+
Raderer et al. (2000)	ohne Kontrollgruppe	21	-	-	+
Rabe et al. (2002)	retrospektiv	63	-	-	
Samonakis et al. (2002)	historische Patienten als Kontrollgruppe randomisiert,	32	+	+	+
Yuen et al. (2002)	plazebo-kontrolliert	35	-	-	-
Dimitroulopoulos et al. (2002)	²	15	+	-	+

¹mit Somatostatinanaloga behandelte Patienten. ²Patienten in der Kontrollgruppe erhielten keine Therapie. ³Behandlungsgruppe: Patienten mit positivem Octreotidscan; Kontrollgruppe: Patienten mit negativem Octreotidscan, Therapieverweigerer und nebenwirkungsbedingte Therapieabbrecher.

In einer 2000 veröffentlichten Studie berichten Raderer et al. über den Einsatz von Lanreotid, einem weiteren Somatostatinanalogon [49]. Während Octreotid eine kurze Halbwertszeit von etwa 100 min. besitzt, kann das Depotpräparat Lanreotid in zweiwöchentlichen Intervallen appliziert werden [20]. 21 Patienten erhielten Lanreotid 30 mg i. m./14 Tage. Bei einem Patienten konnte ein partielles Ansprechen erzielt werden, in 8 Fällen kam es zu einer kurzdauernden Stabilisierung und bei den übrigen Patienten zu einem Tumorprogress. Die mittlere Überlebenszeit lag bei 4,2 Monaten. 19 % der Patienten erreichten einen Anstieg im WHO-Performance-Status von 2,5 bis 6 Monaten Dauer. 24 % der Patienten nahmen an Körpergewicht zu. Zu einer deutlichen Verbesserung der Schmerzsymptomatik kam es bei einem Patienten. 15 Patienten wurden vor Studienbeginn einem Octreotid-Scan unterzogen. Hierbei kommt es zur szintigraphischen Darstellung SSTR-positiven Gewebes mittels radioaktiv markiertem Octreotid. In keinem der Fälle konnten funktionsfähige SSTR nachgewiesen werden, was eine Erklärung für das negative Ergebnis geben könnte.

Eine retrospektive, multizentrische Studie untersuchte 63 Patienten, die an 13 teilnehmenden deutschen Zentren mit Octreotid behandelt wurden [50]. Die Patienten erhielten entweder Octreotid in Depotform (20-30 mg i. m./Monat) oder subkutane Injektionen (3x50-3x300 µg/Tag). Die Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Behandlungsformen. Die durchschnittliche Überlebenszeit betrug 9 Monate. 29 % der Patienten gaben Nebenwirkungen an, zumeist Diarrhöen und Abdominalkrämpfe. Vier Patienten brachen die Behandlung nebenwirkungsbedingt ab.

2002 erschien eine weitere griechische Arbeit, in der 32 Patienten mit fortgeschrittenem, nichtresektablem HCC einer historischen Kontrollgruppe von 27 Patienten gegenübergestellt wurde [51]. 16 Patienten der Behandlungsgruppe erhielten Lanreotid 30 mg i. m. 2x/Monat und 16 Patienten Octreotid LAR 30 mg i. m./Monat. Die mittlere Überlebenszeit der Behandlungsgruppe lag bei 15 Monaten gegenüber 8 Monaten in der Kontrollgruppe. Bei 30 % der Patienten konnte eine Stabilisierung der Tumorerkrankung, bei 10 % ein partielles Ansprechen zum Therapiezeitpunkt erreicht werden. 25 % der Patienten gaben eine Steigerung der Lebensqualität im Karnofsky-Index [54] an.

Yuen et al. veröffentlichten 2002 eine randomisierte, placebokontrollierte Studie, in die 70 Patienten mit fortgeschrittenem, nichtresektablem HCC, die für eine transarterielle Chemoembolisation (TACE) nicht mehr in Frage kamen, eingeschlossen wurden [52]. Verglichen wurde die Gabe von insgesamt 6 Einzeldosen Octreotid LAR 30 mg i. m./Monat, nach vorhergehender Verabreichung von Octreotid 2x250 µg s. c. 2x täglich über 2 Wochen gegen Placebo. Beide Gruppen (n=35) wiesen keinen Unterschied bezüglich der mittleren Lebenserwartung (1,93 Monate gegenüber 1,97 Monaten) auf. Eine Tumorregression oder eine Verbesserung der Lebensqualität war ebenfalls nicht feststellbar. Als einen Grund für das negative Ergebnis nennen die Autoren den hohen Anteil an Patienten mit weit fortgeschrittener Tumorerkrankung (Portalvenenthrombose, Fernmetastasierung) und die Tatsache, dass 37,1 % der behandelten Patienten bereits vor der ersten Injektion von Octreotid LAR verstarben.

Dimitroulopoulos et al. publizierten eine Studie, die 28 Patienten mit fortgeschrittenem, metastasiertem HCC umfasst. Vor Studienbeginn wurde bei allen Patienten eine Szintigraphie mit radioaktiv markiertem Octreotid zur Detektion von SSTR-Rezeptoren durchgeführt [55]. 78,57 % der Patienten wiesen einen Octreotid-Uptake in der Leber auf. 15 der Patienten mit positivem hepatischen Uptake wurden in die Behandlungsgruppe eingeschlossen und erhielten zunächst Octreotid 3x0,5 mg s. c. täglich über 6 Wochen zur Aufsättigung, um eher einen therapeutischen Wirkspiegel zu erreichen [56]. Von Woche 4 bis Woche 8 wurde zusätzlich jeweils Octreotid LAR 20 mg i. m. und ab Woche 12 Octreotid LAR 30 mg i. m. in monatlichen Abständen injiziert. Die mittlere Überlebenszeit lag bei 31 Wochen gegenüber 16 Wochen in der Kontrollgruppe. Die Lebensqualität verbesserte sich bei 60 % der behandelten und 23 % der Patienten in der Kontrollgruppe.

2.8 Somatostatinrezeptoren im HCC

Bislang ist nur wenig über die Expression von Somatostatinrezeptoren in Hepatozellulären Karzinomen bekannt. In einer 1999 von Reubi et al. veröffentlichten Arbeit, die HCCs mittels In-vitro-Rezeptor-Autoradiographie untersuchte, ließen sich bei 41 % der Tumoren Somatostatinrezeptoren nachweisen [57].

In Vorarbeiten zu dieser Promotionsarbeit konnte anhand von RT-PCR-Analysen weniger Tumorproben gezeigt werden, dass HCCs differentielle und individuell-spezifische Expressionsmuster für die unterschiedlichen Somatostatinrezeptoren aufweisen. Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, mit immunhistochemischen Methoden 50 HCCs systematisch im Hinblick auf die Expression der fünf SSTR-Subtypen zu untersuchen und den Rezeptorstatus mit klinischen und histopathologischen Daten zu vergleichen.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien und Substanzen

- Aluminiumkaliumsulfatdodecahydrat Merck KgaA, Darmstadt
- Chloralhydrat Merck KgaA, Darmstadt
- Citronensäure-Monohydrat Merck KgaA, Darmstadt
- Deckgläschen
- Dinatriumhydrogenphosphat Merck KgaA, Darmstadt
- Entellan neu Merck KgaA, Darmstadt
- EnVision+ System HRP Rabbit DakoCytomation GmbH, Hamburg
- Eosin E Merck KgaA, Darmstadt
- Essigsäure Merck KgaA, Darmstadt
- Ethanol 80%, 96%, 100% vergällt Merck KgaA, Darmstadt
- Hämatoxylin Merck KgaA, Darmstadt
- HCl, 2N Merck KgaA, Darmstadt
- Kaliumhydrogenphosphat Merck KgaA, Darmstadt
- Kodak Ektachrome Elite 100/36 Kodak GmbH, Stuttgart
- Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System DakoCytomation GmbH, Hamburg
- Mikrotom-Klingen
- NaOH, 1N Merck KgaA, Darmstadt
- Natriumchlorid Mallinckrodt Baker, Griesheim
- Natriumiodat Merck KgaA, Darmstadt
- Peptide Fragment of of human Somatostatin Receptor 1-5 Gramsch Laboratories, Schwabhausen
- Somatostatinrezeptor-Antikörper 1-5 Human, host: Rabbit Gramsch Laboratories, Schwabhausen
- Superfrost/Plus-Objektträger Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Trizma-Base Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen
- Tween 20 MP Biomedicals GmbH, Eschwege
- Wasserstoffperoxid 30% Merck KgaA, Darmstadt
- Xylol Merck KgaA, Darmstadt

3.2 Puffer

0,01 M TRIS- Puffer pH 7,6

- Trizma-Base
- 2N HCl
- Natriumchlorid

Für die Stammlösung werden 60,5 g Trizma-Base in 700 ml Aqua dest. gelöst. Mit 2 N HCl wird der pH-Wert auf 7,6 eingestellt und nachfolgend mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wird erneut überprüft und anschließend werden 90 g NaCl gelöst. Für die Gebrauchslösung wird die Stammlösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. Zur Verwendung als Waschpuffer wird der Gebrauchslösung Tween 20 im Verhältnis 1:1000 zugegeben. Die Lösung wird im Kühlschrank gelagert.

1 M PBS-Puffer pH 7,2

- Dinatriumhydrogenphosphat
- Kaliumhydrogenphosphat
- NaCl
- 1 N NaOH

Für die Stammlösung werden 28,8 g Dinatriumhydrogenphosphat und 4,9 g Kaliumhydrogenphosphat in 500 ml Aqua dest. gelöst. Nach Zugabe von 160 g NaCl wird mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. Der pH wird mit 1 N NaOH auf einen Wert von 7,2 eingestellt. Für die Gebrauchslösung werden 50 ml Stammlösung mit 950 ml Aqua dest. verdünnt.

Citrat-Puffer 0,01 M pH 6,0

- Citronensäure-Monohydrat
- 2 N NaOH

Zur Herstellung der Stammlösung werden 42 g Citronensäure-Monohydrat in 2 l Aqua dest. gelöst. Um mikrobielles Wachstum zu verhindern wird die Lösung zur Aufbewahrung autoklaviert

Für die Gebrauchslösung wird die Stammlösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und der pH-Wert mit 2 N NaOH auf 6,0 eingestellt..

HE-Färbung (nach Biopsie II)

Hämalaun-Lösung:

- Hämatoxylin
- Natriumiodat
- Aluminiumkaliumsulfatdodecahydrat
- Chloralhydrat
- Citronensäure

Eosin-Lösung:

- Eosin E
- Essigsäure

1 g Hämatoxylin wird in 100 ml erhitztem Aqua dest. auf der Heizplatte gelöst. Lösung anschließend abkühlen lassen. Dann werden in der angegebenen Reihenfolge 200 mg Natriumiodat, 50 g Kalialaun, 50 g Chloralhydrat und 1 g Citronensäure zugegeben. Die Hämalaun-Lösung wird mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt und in einer dunklen Flasche gelagert.

Für die Eosin-Lösung werden 10 g Eosin E in einem Liter Aqua dest. gelöst. Danach werden etwa 10 Tropfen Essigsäure hinzugefügt.

3.3 Untersuchungsmaterial

Für diese Arbeit standen 50 Gewebeproben von 9 Frauen und 41 Männern zur Verfügung, bei denen jeweils ein hepatozelluläres Karzinom diagnostiziert und der Tumor oder die vollständige Leber reseziert wurde. Das durchschnittliche Patientenalter lag zwischen einem und 83 Jahren (Altersmedian 60 Jahre).

Das Untersuchungsmaterial bestand aus in Paraffin eingebetteten Resektionspräparaten, die im Zeitraum von Januar 1996 bis Januar 2002 im Institut für Pathologie der Universität Hamburg aufgearbeitet, histologisch untersucht und beurteilt

wurden. Bei allen Präparaten wurde histologisch ein hepatozelluläres Karzinom diagnostiziert. Ein Befundbericht des Instituts für Pathologie der Universität Hamburg lag vor. Wegen zu kleiner beurteilbarer Volumina wurden Stanzbiopsien von der Untersuchung ausgeschlossen. Zur besseren Beurteilung wurden solche Präparate ausgewählt, bei denen HCC und nicht-maligne verändertes Lebergewebe nebeneinander auf dem Objektträger lagen.

3.4 Pankreasgewebe

Als Positivkontrolle zur immunhistochemischen Darstellung wurde Pankreasgewebe verwendet. Bei den Präparaten handelte es sich ebenfalls um in Paraffin eingebettete Gewebelöcke nichtmalignen Pankreasgewebes aus dem Institut für Pathologie der Universität Hamburg.

3.5 Tumorstadium

Die Zuordnung des Tumorstadiums erfolgte nach der TNM-Klassifikation (UICC, 1997; vgl. Tabelle 3-1). Aufgelistet ist die pT-Kategorie (p=postsurgical), in der die am Resektat nachgewiesene Ausdehnung des Primärtumors angegeben ist. 5 (10 %) der Patienten ließen sich dem Tumorstadium pT1 zuordnen, 28 (56 %), 12 (24 %) bzw. 3 (6 %) den Stadien pT2, pT3 und pT4. In 2 Fällen (4 %) war das Tumorstadium nicht eruierbar.

Tabelle 3-1: TNM-Klassifikation des HCC (UICC 1997)

Kategorie	Definition
T	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Solitärer Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung, ohne Gefäßinvasion
T2	Solitärer Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung, mit Gefäßinvasion, oder multiple Tumoren begrenzt auf einen Lappen, keiner mehr als 2 cm in größter Ausdehnung, ohne Gefäßinvasion, oder solitärer Tumor mehr als 2 cm in größter Ausdehnung, ohne Gefäßinvasion.
T3	Solitärer Tumor mehr als 2 cm in größter Ausdehnung, mit Gefäßinvasion, oder multiple Tumoren begrenzt auf einen Lappen, keiner mehr als 2 cm in größter Ausdehnung, mit Gefäßinvasion, oder multiple Tumoren begrenzt auf einen Lappen, einer davon mehr als 2 cm in größter Ausdehnung, mit oder ohne Gefäßinvasion
T4	Multiple Tumoren in mehr als einem Lappen oder Tumor(en) mit Befall eines größeren Astes der V. portae oder Vv. hepaticae oder Tumor(en) mit Invasion von Nachbarorganen, ausgenommen Gallenblase; oder Tumor(en) mit Perforation des viszeralen Peritoneums
N	Regionäre Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Regionären Lymphknotenmetastasen
M	Fernmetastasen
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

3.6 histologisches Grading

Die Einteilung der HCC zur Einstufung des Malignitätsgrades erfolgte nach histologischen und zytologischen Kriterien auf Basis des vierstufigen Systems von Edmondson und Steiner [58] (vgl. Tabelle 3-2). Patienten mit fibrolamellärem Karzinom bilden eine zusätzliche Kategorie.

G1-Tumoren waren bei 5 Patienten (10 %) und Tumore des Grades G2 bei 40 (80 %) Patienten zu finden. Keiner der untersuchten Tumoren ließ sich den Graden G3 und G4 zuzuordnen. Bei vier Patienten (8 %) wurde ein fibrolamelläres Karzinom als Sonderform des HCC diagnostiziert.

Tabelle 3-2: Histologisches Grading nach Edmondson und Steiner

Grad	Definition
I	Überwiegend trabekulär, nur geringgradige zelluläre Atypiezeichen, meist Galleproduktion, Abgrenzung gegen normale Leber oder Adenom schwierig.
II	Überwiegend tubulär, pseudoglandulär oder azinär, mittelgradige zelluläre Atypiezeichen; häufig Galleproduktion.
III	Überwiegend solid mit weitgehendem Verlust einer organoiden Anordnung; mittel- bis hochgradige zelluläre Atypiezeichen, selten Galleproduktion, häufige Gefäßinvasion.
IV	Solid mit völligem Verlust des organoiden Aufbaues, hochgradige zelluläre Atypiezeichen und verschobene Kern-Plasma-Relation, sehr selten Galleproduktion. Hepatozelluläre Karzinome sind häufig heterogene Tumoren, die gleichzeitig verschiedene Differenzierungsgrade aufweisen. Der Malignitätsgrad steigt mit zunehmender Entdifferenzierung.

3.7 Histologischer Typ

Unabhängig vom Malignitätsgrad lassen sich HCCs in unterschiedliche histologische Typen unterteilen. Die Einteilung erfolgte durch einen erfahrenen Pathologen (Prof. Gocht, ehemals Institut für Pathologie, UKE, Hamburg). Von den untersuchten HCCs wiesen 23 (46 %) einen trabekulären und 10 (20 %) einen pseudoglandulären Typ auf. 7 Tumore (14 %) waren vom Mischtyp und 4 Fälle (8 %) ließen sich, wie schon oben beschrieben, der Sonderform des fibrolamellären Karzinoms zuordnen. Bei 6 Patienten (12 %) war die histologische Zuordnung nicht möglich.

3.8 Zusätzliche Charakteristika

Da 80 % der HCCs auf dem Boden einer Leberzirrhose entstehen wird diese als Präkanzerose aufgefasst. Virale Hepatitis-Erreger sowie chronischer Alkoholabusus sind entscheidende Ursachen für die Ausbildung einer Leberzirrhose [25, 26].

Fünf (10 %) der 50 untersuchten Patienten dieser Arbeit waren mit dem Hepatitis-B-Virus, 11 (22 %) mit dem Hepatitis-C-Virus infiziert. Ein Alkoholabusus war bei 15 Patienten (30 %) bekannt. In 33 Fällen (66 %) lag eine Leberzirrhose vor.

Ein Patient (Nr. 14) wies eine inkomplette, mäßig aktive Leberzirrhose bei klinisch angegebener Hämochromatose auf. In einem weiteren Fall (Nr. 18) lag neben einer Hepatitis-B-Infektion eine zusätzliche Infektion mit dem Hepatitis-D-Virus vor.

Tabelle 3-3: Charakteristika der Patienten und Tumore

Charakteristikum	Fälle (n=50)	proz. Anteil
Altersmedian	60 Jahre	(1-83 Jahre)
<u>Geschlechtsverteilung</u>		
Frauen	9	18 %
Männer	41	82 %
<u>Stadium</u>		
pT1	5	10 %
pT2	28	56 %
pT3	12	24 %
pT4	3	6 %
unbekannt	2	4 %
<u>Differenzierungsgrad</u>		
G1	5	10 %
G2	40	80 %
G3	0	0 %
G4	0	0 %
fibrolamelläres CA	4	8 %
unbekannt	1	2 %
<u>histologischer Typ</u>		
trabekulär	23	46 %
pseudoglandulär	10	20 %
Mischtyp	7	14%
fibrolamellär	4	8 %
unbekannt	6	12 %
Hepatitis B	5	10 %
Hepatitis C	11	22 %
Alkoholabusus	15	30 %
Leberzirrhose	33	66 %

3.9 Anfertigen der Gewebsschnitte

Routinemäßig wird von jeder im Institut für Pathologie der Universität Hamburg untersuchten Gewebeprobe ein repräsentativer Anteil in Paraffin eingebettet und zur Befunddokumentation bzw. für Forschungszwecke archiviert. Diese in Paraffin eingeschlossenen Tumorproben bildeten die Grundlage für die immunhistochemische Untersuchung.

Um das Schneiden zu erleichtern, wurden die Gewebsblöcke auf -20 °C vorgekühlt. Mit einem Schlittenmikrotom wurden Schnitte mit einer Dicke von $3\text{ }\mu\text{m}$ angefertigt, die in ein Wasserbad mit 50 °C überführt und dann auf Objektträger fixiert wurden. Anschließend wurden die Objektträger über Nacht zum Trocknen bei 40 °C in den Wärmeschrank gestellt.

3.10 Immunhistochemie

Immunhistochemische Techniken dienen dem Nachweis und der Identifikation antigener Komponenten in Zellen und Gewebeschnitten mittels spezifische Antikörper.

In zahlreichen Vorversuchen erfolgte die Auswahl des optimalen immunhistochemischen Nachweisverfahrens, der eingesetzten Konzentration des Primärantikörpers und der Vorbehandlung zur Demaskierung antigener Strukturen. Letztendlich fiel die Wahl auf das EnVision-Detektionssystem.

Das EnVision 2-Schritt-Detektionssystem basiert auf der Kopplung mehrerer Sekundärantikörper- und Meerrettichperoxidase-molekülen an ein Dextran-Polymertorso (vgl. Abbildung 3-1). Das Vorhandensein von Sekundärantikörper und Enzymmolekül auf dem gleichen Polymer verringert Zeitbedarf und Arbeitsaufwand, da gegenüber herkömmlichen Nachweisverfahren ein Inkubationsschritt entfällt. Im Gegensatz zur weit verbreiteten ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex) kommt das EnVision-System ohne Biotin aus. Hintergrundreaktionen durch endogenes Biotin, das sich reichlich in Lebergewebe nachweisen lässt [59], treten somit nicht auf.

In der Gegenüberstellung mit weit verbreiteten immunhistochemischen Verfahren wie APAAP, CSA, LSAB und SABC erzielt das EnVision-System als Zwei-Schritt-Verfahren vergleichbare Resultate bei niedrigerem Arbeitsaufwand und geringerer Antikörper-Verdünnung [60].

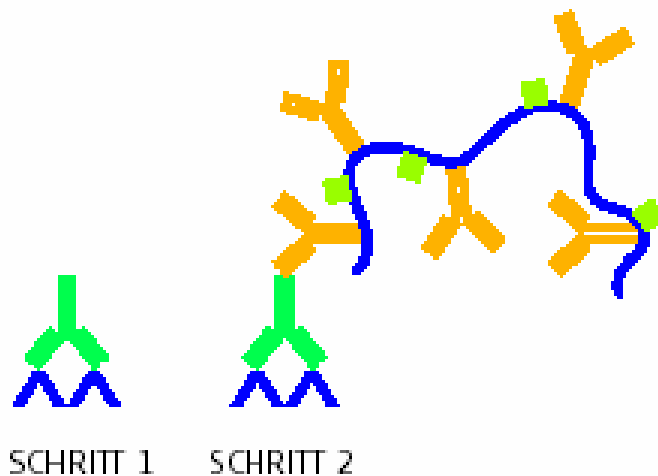


Abbildung 3-1: Bei der 2-Schritt EnVision™-Methode folgt dem Primärantikörper (Schritt 1) ein Dextranpolymer (Schritt 2), das durchschnittlich 10 Moleküle Sekundärantikörper und 70 Enzymmoleküle enthält (Peroxidase-Blockierungs- und Waschschriffe nicht dargestellt). Verwendung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Firma DakoCytomation, Hamburg.

3.11 Primärantikörper

Als Primärantikörper wurden die Rabbit-anti-Human-SSTR-Antikörper 1, 2A, 3, 4 und 5 der Firma Gramsch Laboratories, Schwabhausen, eingesetzt. Diese wurden in einer Reihe von Veröffentlichungen ausführlich charakterisiert und praktischer Anwendung unterzogen [61-65].

3.12 Antigen-Demaskierung

In formalinfixiertem Gewebe kann der Nachweis eines Antigens erschwert sein. Die Fixierung mit Formalin führt zur Ausbildung von Aldehydvernetzungen, welche die Bindung des Antikörpers verhindern können. Zudem kann sich die Konformation des Antigens verändern und damit für den Antikörper nicht mehr erkennbar sein. Das Antigen ist dann „maskiert“. Es existieren verschiedene Verfahren zur Antigen-Demaskierung. Ihr Nutzen liegt in einer Verstärkung der Signalintensität, da die Zahl der zur Verfügung stehenden Antikörperbindungsstellen gegenüber dem unbehandelten Gewebe größer ist. Die Endverdünnung des Primärantikör-

pers kann gesteigert werden, was vor allem für die Routineanwendung und bei teuren Antikörpern Kosten senkt [66].

Neben Verfahren zur enzymatischen Demaskierung kann eine Vorbehandlung ebenfalls durch hitzeinduzierte Demaskierung erfolgen. 1991 wurde durch Shi et al. der Einsatz von Mikrowellen zur Hitzedemaskierung beschrieben. In dieser Arbeit wird eine handelsübliche Haushaltsmikrowelle mit 800 Watt Leistung eingesetzt. Die Verwendung von Citratpuffer (pH 6,0) verbessert das Ergebnis zusätzlich [67-69].

3.13 Blockade der endogenen Peroxidase

Durch die Formalinfixierung und die Einbettung des Untersuchungsgutes wird die endogene Enzymaktivität des Gewebes nicht völlig zerstört. In dieser Arbeit wurde DAB als Chromogen zur Entwicklung der Farbreaktion eingesetzt. Zur immunhistochemischen Darstellung werden antikörpergekoppelte Peroxidasemoleküle an das darzustellende Antigen gebunden. Nach Zugabe von Substratpuffer, Wasserstoffperoxid als Katalysator und DAB-Chromogen entsteht das farbige Endprodukt. Da das Substrat-Chromogen-System nicht zwischen endogener und der nachträglich zugegebenen Peroxidase unterscheidet, kann es bei fehlender Blockade der endogenen Aktivität zu Hintergrundfärbungen oder zu falsch positiven Ergebnissen kommen.

Das einfachste Mittel zur Elimination der endogenen Peroxidase ist eine Inkubation des Präparats mit Wasserstoffperoxids [66], wie es auch in dieser Arbeit zur Anwendung kommt.

3.14 Durchführung der Immunhistochemie

Folgendes Protokoll wurde zur Durchführung der immunhistochemischen Darstellung der SSTR-Subtypen erarbeitet und angewandt:

1. Schnitte auf dem Objektträger in Xylol entparaffinieren und in einer aufsteigenden Alkoholreihe rehydrieren:
 - a. 2x Xylol je 10 min.

- b. 2x Alkohol 100% je 5 min.
 - c. 2x Alkohol 96% je 5 min.
 - d. 2x Alkohol 80% je 5 min.
- 2. Waschen in Tris-Puffer + Tween 20 für 3 min.
- 3. Antigen-Demaskierung mit 10mM Citratpuffer (pH 6,0) für 20 min bei 800 Watt in einer handelsüblichen Haushaltsmikrowelle. Überführen der Objektträger in ein Plastikgefäß. Ein zweites Plastikgefäß mit Puffer mit in die Mikrowelle zu stellen. In Intervallen von 4 min den verdunsteten Citratpuffer mit heißem Puffer aus dem zweiten Gefäß auffüllen. Die Schnitte müssen immer von Puffer bedeckt sein.
- 4. Objektträger im Plastikgefäß 20 min abkühlen lassen.
- 5. Waschen in Tris-Puffer + Tween 20 für 3 min.
- 6. Blockieren der endogenen Peroxidase mit 3% H₂O₂ in PBS-Puffer für 15 min bei RT auf einem Schüttler. Peroxidase-Lösung stets frisch ansetzen.
- 7. Dreimaliges Waschen in Tris-Puffer.
- 8. Inkubation mit dem Primär-AK (Verdünnung 1:1000, 100 µl je Schnitt) über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer.
- 9. Waschen in Tris-Puffer + Tween 20 für 3 min.
- 10. Inkubation mit EnVision (100 µl) für 30 min bei Raumtemperatur.
- 11. Waschen in Tris-Puffer + Tween 20 für 3 min.
- 12. Färben mit DAB-Chromogen-Substrat (100 µl) für 10 min bei Raumtemperatur.
- 13. Waschen in Tris-Puffer + Tween 20 für 3 min.
- 14. Gegenfärben mit Hämatoxylin (15 s, danach 5 min. unter fließendem Wasser bläuen).
- 15. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe und überführen in Xylol:
 - a. 2x Alkohol 80% je 3-5 min.
 - b. 2x Alkohol 96% je 3-5 min.
 - c. 2x Alkohol 100% je 10 min.
 - d. 2x Xylol je 10 min.
- 16. Eindecken mit Entellan.

3.15 Positivkontrolle

Als Positivkontrolle wurde ein Objektträger mit Pankreasgewebe in jeder Serie mitgeführt. Die endokrinen Langerhans-Inselzellen des endokrinen Pankreas exprimieren alle fünf SSTR-Subtypen und konnten mit immunhistochemischen Methoden nachgewiesen werden [15, 70]. In Voruntersuchungen wurde gezeigt, dass sich Pankreasinseln mit dem verwendeten Protokoll eindeutig und spezifisch darstellen lassen.

3.16 Negativkontrolle

Von jedem Untersuchungsfall wurde ebenfalls eine Negativkontrolle zum Ausschluss unspezifischer Reaktionen angefertigt. Dies geschah durch Weglassen des Primärantikörpers.

3.17 Spezifitätskontrolle

Einen guten Hinweis auf die Spezifität der eingesetzten Antikörper ergab deren Anwendung bei Pankreasgewebe. Hier kam es zu einer selektiven Darstellung der Inselzellen, während sich das umgebende exokrine Pankreas nicht anfärbte.

3.18 Präabsorption

Die Präabsorptionskontrolle dient ebenfalls dem Spezifitätsnachweis des eingesetzten Antikörpers. Hierbei wird der Antikörper zusammen mit dem Peptid inkubiert, das zur Generierung des Antikörpers verwendet wurde. Das Peptid wird im Überschuss zugegeben und bindet den Antikörper. Die derart blockierten Antikörper können dann im Verlauf keine Reaktion mehr mit dem entsprechenden Gewebsantigen eingehen [71].

Das Protokoll zur Durchführung der Präabsorption folgt weitgehend dem oben dargestellten Immunhistochemie-Protokoll. Anstelle des Primärantikörpers wird allerdings hier in Schritt 8 das Peptid-Antikörper-Gemisch eingesetzt. Verwendet wurden Schnitte mit HCC-Gewebe.

1. Ansatz des Peptid-Antikörper-Gemisches. Der Antikörper besitzt eine 1:1000 Endverdünnung, das Peptid liegt in 10-fachem Überschuss vor. PBS-Puffer dient als Verdünnungsmedium. Für jeden Schnitt werden 200 µl angesetzt.
2. Ansatz der Positivkontrolle (200 µl pro Schnitt). Als Positivkontrolle wird der Primärantikörper in einer Konzentration von 1:1000 verwendet. Verdünnungsmedium ist PBS-Puffer.
3. Das Peptid-Antikörper-Gemisch und die Positivkontrolle werden für 2 h bei 37°C und mittlerer Geschwindigkeit auf dem Schüttler inkubiert.
4. Anschließend werden beide Ansätze bei 16.000 g über 30 min zentrifugiert.
5. Vom Peptid-Antikörper-Gemisch und von der Positivkontrolle wird vorsichtig der Überstand abpipettiert (je 100 µl pro Schnitt)
6. Inkubation der Schnitte mit dem Überstand (je 100 µl) über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer.

Bei erfolgreicher Präabsorption ist auf dem Objektträger keine Färbung feststellbar. Der Kontrollschnitt hingegen ist angefärbt.

3.19 Auswertung

Die Auswertung und Beurteilung erfolgte lichtmikroskopisch durch zwei Begutachter. Zunächst wertete jeder Begutachter unabhängig die Präparate mehrfach aus. In einem zweiten Schritt wurden abweichende Ergebnisse noch einmal gemeinsam beurteilt und diskutiert, bis ein Konsens hergestellt war.

Beurteilungskriterien waren An- bzw. Abwesenheit einer Anfärbung des Tumors und die Signalintensität. Die Stärke der Färbung des Tumors wurde mit der des nicht malignen Lebergewebes verglichen. Weiterhin wurde die Anzahl der angefärbten Tumorzellen in Relation zum gesamten sichtbaren Tumor betrachtet. Vergleiche mit den Negativ- und Positivkontrollen brachten Aussagen über eine möglicherweise vorhandene unspezifische Hintergrundfärbung.

3.20 Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin

Von jedem der 50 Fälle wurde eine Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin angefertigt, um das Gewebe in Hinblick auf pathologische Veränderungen und Digni-

tät besser beurteilen zu können. Die HE-Färbung stellt saure Strukturen rot und basische blau dar. Die Färbeprozedur erfolgte nach folgendem Ablauf:

1. Schnitte auf dem Objektträger in Xylol entparaffinieren und in einer aufsteigenden Alkoholreihe rehydrieren:
 - a. 2x Xylol je 5 min.
 - b. 2x Alkohol 100% je 2 min.
 - c. 2x Alkohol 96% je 2 min.
 - d. 2x Alkohol 80% je 2 min.
2. Waschen in Tris-Puffer + Tween 20 für 3 min.
3. Anfärben der Zellkerne im Hämalaunbad für 10 min.
4. Unter fließendem Leitungswasser werden die Schnitte 10 min gebläut.
5. Gegenfärben mit Eosin-Lösung für 5 min.
6. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe und überführen in Xylol:
 - a. 2x Alkohol 80% je 30 s
 - b. 2x Alkohol 96% je 30 s
 - c. 2x Alkohol 100% je 1 min
 - d. 2x Xylol je 10 min.
7. Eindecken mit Entellan.

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnis der Immunhistochemie

Eine Serie von 50 HCCs wurde immunhistochemisch auf die Expression der SSTR1–5 hin untersucht. Tabelle 4-2 und Tabelle 4-3 zeigen das spezifische Expressionsmuster der einzelnen Tumore. SSTR1 stellte sich 24 (48 %), SSTR2 in 19 (38 %), SSTR3 in 34 (68 %) und SSTR5 (74 %) der Fälle positiv dar. SSTR4 konnte in keinem einzigen Fall nachgewiesen werden. Damit ist SSTR5 der am häufigsten nachgewiesene Subtyp, gefolgt von SSTR3>SSTR1>SSTR2>SSTR4.

Bei lediglich 10 (20 %) von 50 Tumoren war kein einziger SSTR-Subtyp nachweisbar. In den übrigen Fällen konnte gezeigt werden, dass HCCs ein differentielles Expressionsmuster für SSTRs besitzen. 12 verschiedene Expressionsmuster konnten identifiziert werden. Bei insgesamt 10 (20 %) Tumoren fand sich eine kombinierte Expression von SSTR1, SSTR2, SSTR3 und SSTR5. 11 (22 %) der Tumoren exprimierten SSTR1, SSTR3 und SSTR5, was hiermit in dieser Untersuchungsreihe das am häufigsten aufgefundene Expressionsmuster war. Ebenfalls noch häufig, mit jeweils 5 (10 %) Tumoren, waren die Kombinationen SSTR2, SSTR3 und SSTR5, bzw. SSTR3 und SSTR5.

Tabelle 4-1: SSTR-Rezeptorexpressionsmuster. Insgesamt 12 verschiedene Expressionsmuster waren nachweisbar. 22 % der untersuchten Tumoren wiesen die Rezeptorkonstellation SSTR1, SSTR3, SSTR5 auf.

SSTR-Subtypen					Häufigkeit	
SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5		
+	-	+	-	+	11 (22 %)	
-	-	-	-	-	10 (20 %)	
+	+	+	-	+	10 (20 %)	
-	+	+	-	+	5 (10 %)	
-	-	+	-	+	5 (10 %)	
-	-	-	-	+	3 (6 %)	
-	-	+	-	-	1 (2 %)	
-	+	-	-	+	1 (2 %)	
-	+	+	-	-	1 (2 %)	
+	-	-	-	+	1 (2 %)	
+	+	-	-	-	1 (2 %)	
+	+	+	-	-	1 (2 %)	

Tabelle 4-2: SSTR-Expression in HCCs. *m* – männlich, *w* – weiblich, + positiv, - negativ

Nr.	Alter	Geschlecht	SSTR-Subtypen				
			SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
1	72	m	-	-	-	-	-
2	56	m	+	+	+	-	+
3	59	m	-	+	+	-	+
4	51	m	-	+	+	-	+
5	64	m	-	-	-	-	-
6	57	m	-	+	+	-	+
7	18	m	-	-	-	-	+
8	61	m	-	-	+	-	+
9	43	w	-	-	-	-	-
10	57	m	-	-	-	-	+
11	60	w	+	+	+	-	+
12	50	m	+	-	+	-	+
13	65	m	+	-	+	-	+
14	56	m	-	-	-	-	-
15	73	w	-	-	-	-	-
16	61	m	+	+	-	-	+
17	71	m	+	-	+	-	+
18	53	m	+	-	+	-	+
20	73	m	-	-	-	-	+
21	66	m	+	-	-	-	+
22	56	m	+	-	+	-	+
24	83	w	+	-	+	-	+
25	52	m	+	-	+	-	+
26	73	m	+	+	+	-	-
27	66	m	+	-	+	-	+
28	65	m	-	-	+	-	+
29	69	m	-	-	+	-	+
30	59	m	-	-	-	-	-
31	56	m	+	-	+	-	+
32	66	m	+	+	+	-	+
33	68	m	-	-	-	-	-
34	40	w	-	-	-	-	-
35	59	m	-	-	+	-	+
36	64	w	+	-	+	-	+
37	73	m	+	+	+	-	+
38	62	m	+	+	+	-	+
39	71	m	-	-	+	-	+
40	70	m	-	+	+	-	+
41	69	m	-	+	-	-	+
42	34	m	+	+	+	-	+
43	60	m	-	+	+	-	+
44	64	m	+	-	+	-	+
46	62	w	+	+	+	-	+
47	56	m	-	-	+	-	-
48	71	m	-	-	-	-	-
49	59	m	+	+	+	-	+
50	59	w	+	+	+	-	+
51	1	w	+	+	+	-	+
52	68	m	-	-	-	-	-
53	69	m	-	+	+	-	-
Positive Fälle			48 %	38 %	68 %	0 %	74 %

Tabelle 4-3: SSTR-Expression in HCCs (Fortsetzung). *FL* – fibrolamelläres Karzinom, *t* – trabekulär, *p* – pseudoglandulär, *m* – Mischtyp, *fl* – fibrolamellär

Nr.	Stadium	Grading	Hepatitis B	Hepatitis C	Alkoholabusus	Leberzirrhose	Histologischer Typ
1	pT2	G2	nein	ja	nein	ja	t
2	pT4	G2	nein	nein	ja	ja	pg
3	pT2	G2	nein	nein	nein	ja	t
4	pT2	G2	nein	ja	nein	ja	pg
5	pT3	FL	nein	nein	nein	nein	fl
6	pT1	G2	nein	nein	nein	ja	t
7	pT1	FL	nein	nein	nein	nein	fl
8	pT2	G2	nein	nein	nein	nein	m
9	unbekannt	unbekannt	ausgeheilt	ja	ja	ja	t
10	unbekannt	G2	nein	nein	nein	ja	t
11	pT3	G1	nein	ja	nein	ja	t
12	pT1	G1	ja	nein	ja	ja	t
13	pT1	G2	nein	ja	nein	ja	t
14	pT3	G2	nein	nein	nein	ja	t
15	pT3	FL	nein	nein	nein	nein	fl
16	pT2	G2	ja	nein	nein	ja	t
17	pT2	G2	nein	nein	nein	nein	t
18	pT2	G2	ja	nein	nein	ja	pg
20	pT2	G2	nein	nein	nein	nein	t
21	pT2	G2	nein	nein	ja	ja	pg
22	pT2	G1	nein	nein	nein	nein	t
24	pT2	G2	nein	nein	nein	nein	pg
25	pT2	G2	nein	ja	nein	ja	pg
26	pT2	G2	nein	nein	ja	ja	t
27	pT3	G2	nein	nein	ja	ja	m
28	pT3	G2	nein	nein	ja	ja	m
29	pT2	G2	nein	nein	nein	nein	t
30	pT3	G2	nein	nein	nein	nein	m
31	pT2	G2	nein	nein	ja	ja	t
32	pT2	G2	ja	nein	nein	ja	pg
33	pT2	G2	nein	ja	nein	ja	m
34	pT3	G2	nein	nein	nein	nein	pg
35	pT2	G2	nein	nein	ja	ja	m
36	pT2	G2	nein	nein	ja	ja	m
37	pT2	G2	nein	nein	nein	nein	t
38	pT2	G2	nein	ja	nein	ja	pg
39	pT2	G1	nein	nein	nein	ja	unbekannt
40	pT2	G2	nein	ja	nein	ja	t
41	pT2	G1	nein	nein	nein	nein	pg
42	pT1	FL	nein	nein	nein	nein	fl
43	pT3	G2	nein	nein	ja	ja	t
44	pT2	G2	ja	nein	nein	ja	unbekannt
46	pT2	G2	nein	nein	ja	ja	t
47	pT3	G2	nein	nein	nein	nein	t
48	pT3	G2	nein	nein	nein	nein	t
49	pT4	G2	nein	ja	nein	ja	unbekannt
50	pT4	G2	nein	ja	nein	ja	unbekannt
51	pT2	G2	nein	nein	ja	ja	t
52	pT2	G2	nein	nein	ja	nein	unbekannt
53	pT3	G2	nein	nein	ja	ja	unbekannt

Bei nahezu allen Tumoren war die Färbung homogen im Zytoplasma und der Zellmembran unter Aussparung des Zellkerns lokalisiert (siehe Abbildung 4-1). In der Mehrzahl der Fälle fand sich eine einheitliche Anfärbung des gesamten Tumorgewebes. Die Stärke der Immunreaktion schwankte in ihrem Ausprägungsgrad beträchtlich zwischen einzelnen Tumoren, was eine unterschiedliche Dichte der SSTR-Expression nahe legt. Gelegentlich zeigte sich ein heterogenes Bild in der Immunfärbung, vor allem bei Tumoren des Mischtyps, wo etwa pseudoglanduläre und tubuläre Areale ein unterschiedliches Färbeverhalten aufwiesen. Selten waren Tumoren, die nur fokal SSTR-Rezeptoren exprimierten, der überwiegende Anteil des Tumors sich aber rezeptornegativ darstellte. Ein Beispiel hierfür ist Nr. 37 in Abbildung 4-1.

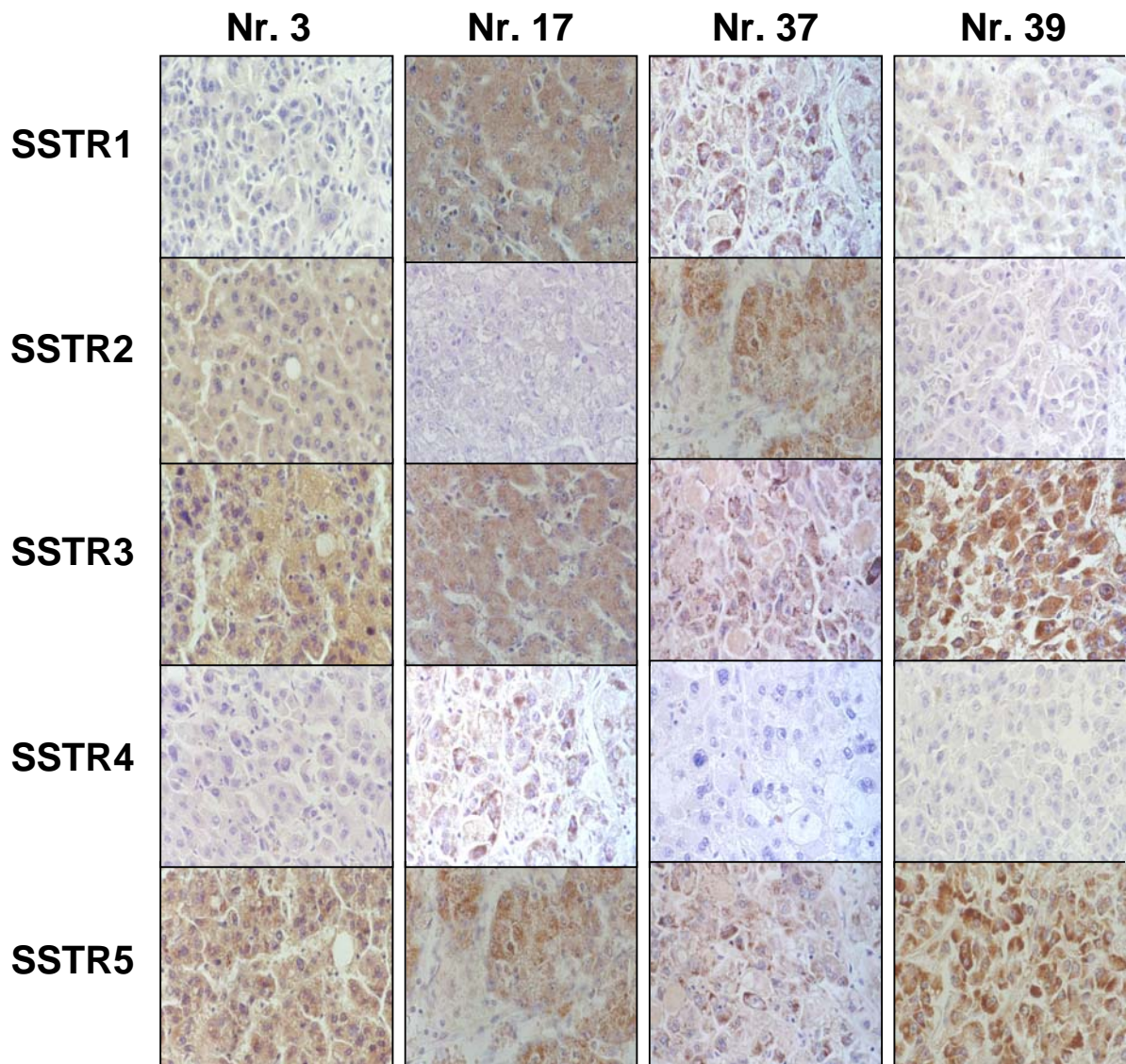


Abbildung 4-1: Unterschiedliche SSTR-Expressionsmuster und –dichte in HCC. Immunhistochemischer Nachweis für SSTR2, SSTR3 und SSTR5 für Nr. 3. Bei Nr. 17 stellen sich SSTR1, SSTR3 und SSTR5 dar. Nr. 37 ist positiv für SSTR1 SSTR2, SSTR3 und SSTR5. Interessant ist die eher fokale SSTR-Expression mit geringerer Expressionsdichte. SSTR3 und SSTR5 werden bei Nr. 39 exprimiert. Vergrößerung: 40-fach.

4.2 Vergleich mit Klinik und Histopathologie

Untersucht wurde das SSTR-Expressionsmuster im Hinblick auf Korrelationen zwischen der Subtyp-Verteilung und Patientengeschlecht, Tumorstadium, histologischem Grading, Tumortyp, Vorliegen einer Infektion mit dem Hepatitis-B- oder Hepatitis-C-Virus, Leberzirrhose und Alkoholabusus (siehe Tabelle 4-4 - Tabelle 4-11)

Den Zusammenhang zwischen Hepatitis-B-Infektion und SSTR-Expression betreffend, war bei Hepatitis-B-positiven Patienten die Rezeptorexpression durchweg höher als im Durchschnitt (siehe Tabelle 4-8). Bei 100 % (gegenüber 48 % im Durchschnitt) dieser Patienten ließ sich der SSTR1-Rezeptor, bei 40 % (gegenüber 38 %) der SSTR2-Rezeptor, bei 80 % (gegenüber 68 %) der SSTR3-Rezeptor und bei 100 % (gegenüber 74 %) der Patienten der SSTR5-Rezeptor nachweisen. Einschränkend muss aber wiederum erwähnt werden, dass es sich hierbei lediglich um 5 Fälle handelt.

Das fibrolamelläre Karzinom, das in vieler Hinsicht einen Sonderfall des HCC darstellt, zeichnete sich in dieser Untersuchung durch eine, im Vergleich mit den übrigen histologischen Typen, geringere SSTR-Expression aus. Nur in jeweils einem von vier Fällen (25 %) war der Nachweis für SSTR1, 2 und 3 positiv. Zwei von 4 untersuchten fibrolamellären Karzinomen (50 %) waren SSTR5-positiv. Interessanterweise lag bei keinem der vier Patienten eine Leberzirrhose, eine Infektion mit dem Hepatitis-B- oder Hepatitis-C-Virus oder ein Alkoholabusus als typischer Risikofaktor für die Entstehung eines HCC vor.

Patienten ohne begleitende Leberzirrhose wiesen in dieser Untersuchung stets geringere Subtypexpressionen als Patienten mit Leberzirrhose oder das Gesamtkollektiv auf (vgl. Tabelle 4-10). Von den 17 Patienten mit Leberzirrhose exprimierten 29 % (gegenüber 48 % im Durchschnitt) den SSTR1-Rezeptor, 18 % (gegenüber 38 %) den SSTR2-Rezeptor, 47 % den SSTR3-Rezeptor (gegenüber 68 %) und 59 % (gegenüber 74 %) den SSTR5-Rezeptor.

Die vorliegenden Daten lassen ansonsten aber vermuten, dass SSTR-Expression und die oben aufgezählten Variablen unabhängig voneinander vorliegen.

Tabelle 4-4: Korrelation zwischen SSTR-Expression und Patientengeschlecht.

	Anzahl	SSTR1		SSTR2		SSTR3		SSTR4		SSTR5	
		abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.
männlich	41	18	44%	15	37%	28	68%	0	-	31	76%
weiblich	9	6	67%	4	44%	6	67%	0	-	6	67%
Summe	50	24	48%	19	38%	34	68%	0	-	37	74%

Tabelle 4-5: Korrelation zwischen SSTR-Expression und Tumorstadium (pT).

	Anzahl	SSTR1		SSTR2		SSTR3		SSTR4		SSTR5	
		abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.
pT1	5	3	60%	2	40%	4	80%	0	-	5	100%
pT2	28	16	57%	11	39%	21	75%	0	-	24	86%
pT3	12	2	17%	3	25%	6	50%	0	-	4	33%
pT4	3	3	100%	3	100%	3	100%	0	-	3	100%
unbekannt	2	0	-	0	-	0	0%	0	-	1	50%
Summe	50	24	48%	19	38%	34	68%	0	-	37	74%

Tabelle 4-6: Korrelation zwischen SSTR-Expression und histologischem Grading.

	Anzahl	SSTR1		SSTR2		SSTR3		SSTR4		SSTR5	
		abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.
G1	5	3	60%	2	40%	4	80%	0	-	5	100%
G2	40	20	50%	16	40%	29	73%	0	-	30	75%
G3	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
G4	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
fibrol. CA	4	1	25%	1	25%	1	25%	0	-	2	50%
unbekannt	1	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
Summe	50	24	48%	19	38%	34	68%	0	-	37	74%

Tabelle 4-7: Korrelation zwischen SSTR-Expression und histologischem Typ.

	Anzahl	SSTR1		SSTR2		SSTR3		SSTR4		SSTR5	
		abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.
trabekulär	23	10	44%	10	44%	16	70%	0	-	17	74%
pseudogland.	10	8	80%	5	50%	7	70%	0	-	9	90%
Mischtyp	7	2	29%	0	-	5	71%	0	-	5	71%
fibrolamellär	4	1	25%	1	25%	1	25%	0	-	2	50%
unbekannt	6	3	50%	3	50%	5	83%	0	-	4	67%
Summe	50	24	48%	19	38%	34	68%	0	-	37	74%

Tabelle 4-8: Korrelation zwischen SSTR-Expression und Hepatitis-B-Infektion.

	Anzahl	SSTR1		SSTR2		SSTR3		SSTR4		SSTR5	
		abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.
Hepatitis B positiv	5	5	100%	2	40%	4	80%	0	-	5	100%
Hepatitis B negativ	45	19	42%	17	38%	30	67%	0	-	32	71%
Summe	40	24	48%	19	38%	34	68%	0	-	37	74%

Tabelle 4-9: Korrelation zwischen SSTR-Expression und Hepatitis-C-Infektion

Hepatitis C	Anzahl	SSTR1		SSTR2		SSTR3		SSTR4		SSTR5	
		abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.
positiv	11	6	55%	6	55%	6	55%	0	-	8	73%
negativ	39	18	46%	13	33%	28	72%	0	-	29	74%
Summe	50	24	48%	19	38%	34	68%	0	-	37	74%

Tabelle 4-10: Korrelation zwischen SSTR-Expression und vorliegender Leberzirrhose.

Leberzirrhose	Anzahl	SSTR1		SSTR2		SSTR3		SSTR4		SSTR5	
		abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.
positiv	33	19	58%	16	49%	26	79%	0	-	27	82%
negativ	17	5	29%	3	18%	8	47%	0	-	10	59%
Summe	50	24	48%	19	38%	34	68%	0	-	37	74%

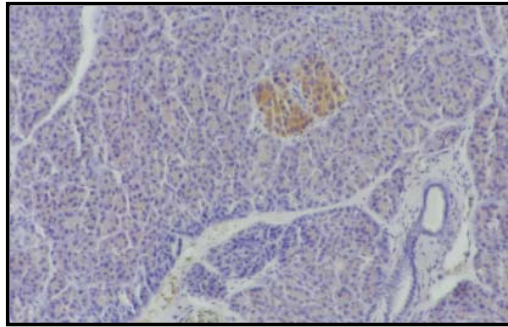
Tabelle 4-11: Korrelation zwischen SSTR-Expression und vorliegendem Alkoholabusus.

Alkoholabusus	Anzahl	SSTR1		SSTR2		SSTR3		SSTR4		SSTR5	
		abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.
ja	15	9	60%	6	40%	12	80%	0	-	11	73%
nein	35	15	43%	13	37%	22	63%	0	-	26	74%
Summe	50	24	48%	19	38%	34	68%	0	-	37	74%

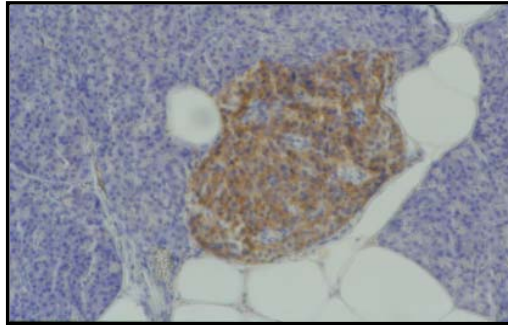
4.3 Positivkontrolle

Gesundes Pankreasgewebe diente als Positivkontrolle. Immunhistochemisch ließen sich, wie auch in der Literatur beschrieben [65], alle fünf SSTR in den Inselzellen des Pankreas nachweisen (siehe Abbildung 4-2). Die Anfärbarkeit war eindeutig und scharf auf die Langerhans-Inseln begrenzt, ohne Darstellung des umgebenden exokrinen Pankreasgewebe. Der SSTR4-Rezeptor war nur in wenigen Inselzellen darstellbar und das Färbeergebnis blass, jedoch eindeutig.

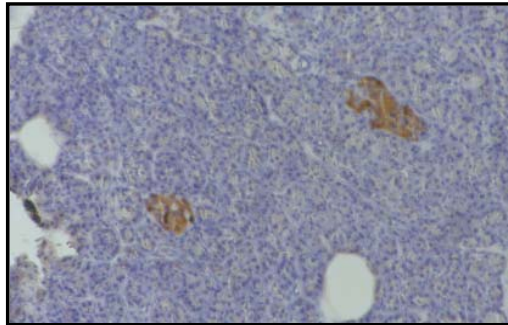
SSTR1



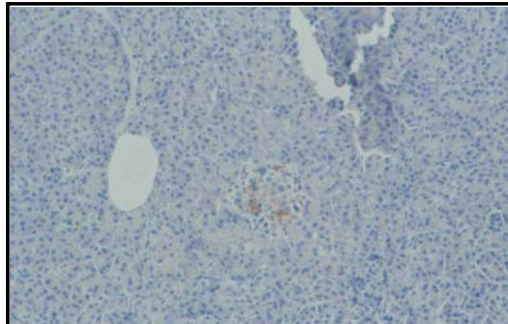
SSTR2



SSTR3



SSTR4



SSTR5

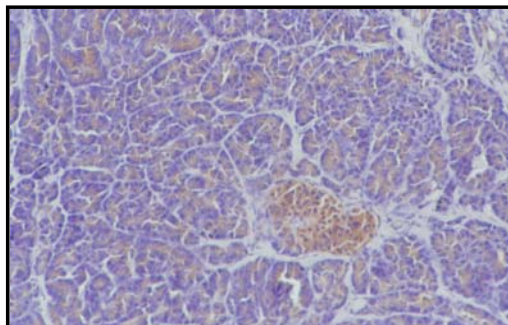


Abbildung 4-2: Immunohistochemischer Nachweis der SSTR-Expression in den Inselzellen des humanen Pankreas. Die braune Färbung signalisiert das Vorhandensein von SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR4 und SSTR5 spezifisch lokalisiert in den Inselzellen des Pankreas. Vergrößerung: 25-fach.

4.4 Negativkontrolle

Die von jedem Tumor durch Weglassen des Primärantikörpers angefertigte Kontrolle war in allen Fällen negativ. Keiner der Gewebsschnitte wies eine unspezifische Anfärbung auf.

4.5 Präabsorption

Die Präabsorption des Antikörpers mit seinem entsprechenden Antigenpeptid dient dem Nachweis der Spezifität des Antikörpers und wurde für alle fünf Rezeptor-Subtypen durchgeführt. Im verwendeten HCC-Gewebe kam es nach Durchführung der Präabsorption zu keiner Immunfärbung, während sich bei den mitgeführten Kontrollproben, in denen das Antigenpeptid durch PBS-Puffer ersetzt wurde, SSTRs nachweisen ließen (siehe Abbildung 4-3).

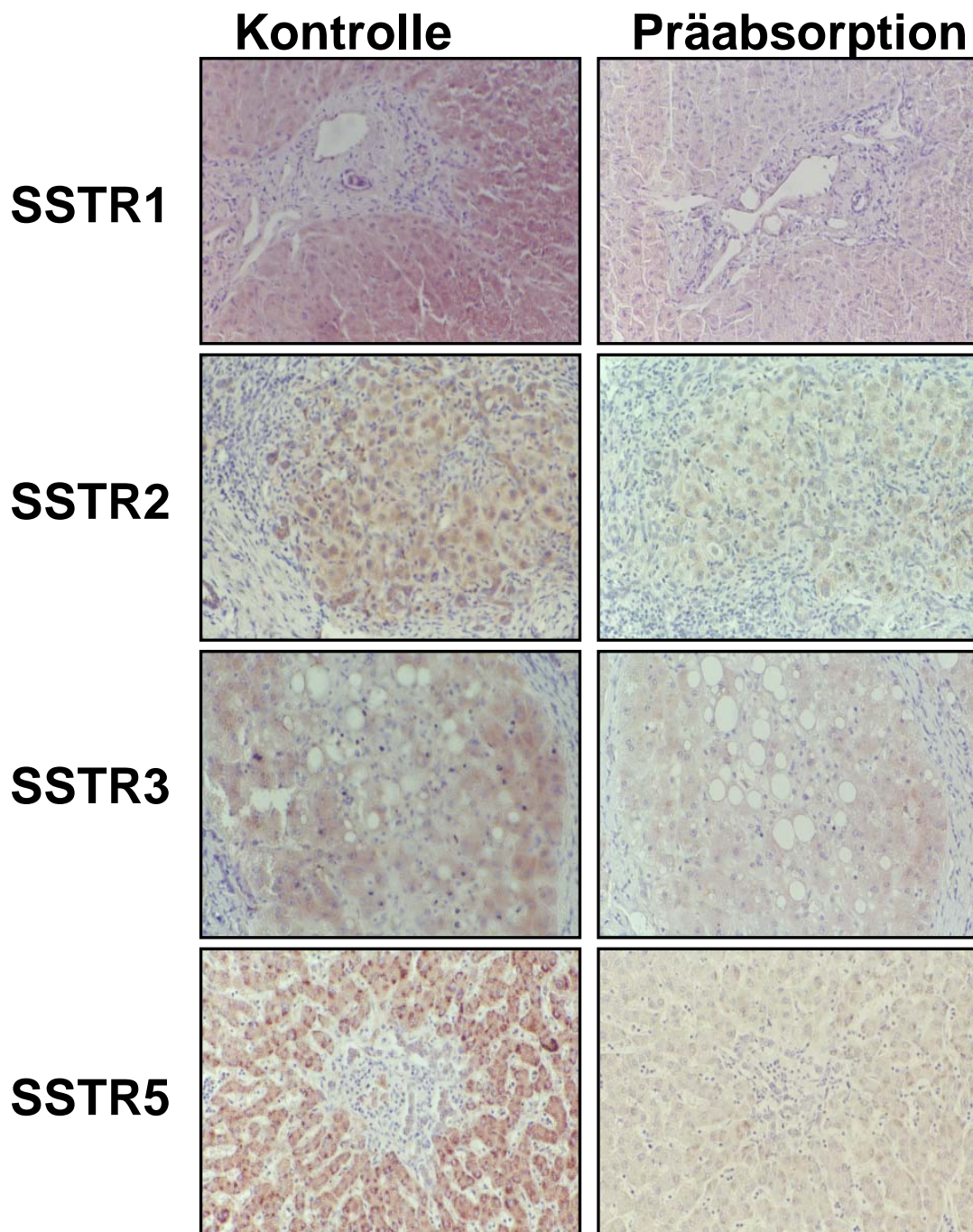


Abbildung 4-3: Immunhistochemischer Nachweis der SSTR-Expression in HCC und Hemmung der Anfärbung durch Präabsorption mit dem Antigenpeptid. Darstellung von SSTR1, SSTR2, SSTR3 und SSTR5 nach Einsatz des Chromogens DAB (braune Färbung, linke Spalte). Präabsorption mit dem jeweiligen Antigenpeptid hemmt die Anfärbbarkeit (rechte Spalte) und weist die Spezifität des eingesetzten Antikörpers nach. Vergrößerung: 25-fach.

5. Diskussion

5.1 Hepatozelluläre Karzinome zeigen ein differentielles SSTR-Expressionsmuster

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Serie von 50 HCCs immunhistochemisch hinsichtlich der Expression der fünf SSTR-Subtypen untersucht.

1998 zeigten Reubi et al. mittels In-vitro-Rezeptorautoradiographie, dass HCC Somatostatinrezeptoren exprimieren [57]. Durch radioaktiv markiertes Somatostatin-28, bzw. Octreotid ließen sich in 41 % der untersuchten Tumorproben SSTR nachweisen, ohne allerdings weiteren Aufschluss über die Distribution der einzelnen SSTR-Subtypen zu geben. In dieser Arbeit lag der Anteil der SSTR-positiven Tumoren unter 50 untersuchten HCC-Fällen bei 80 %. Eventuell ist die Sensitivität der In-vitro-Rezeptor-Autoradiographie nicht ausreichend hoch genug, um insbesondere Tumoren mit fokaler oder schwacher Rezeptorexpression nachzuweisen. Im Vergleich zu den als Positivkontrollen herangezogenen pankreatischen Inselzellen, wiesen viele der hier untersuchten HCCs eine sehr viel schwächere Anfärbbarkeit auf oder die Expression war fokal und gelegentlich bloß auf einzelne Zellen begrenzt.

Von einer ganzen Reihe menschlicher Tumoren ist die Expression von Somatostatinrezeptoren bekannt. Hierunter fallen neuroendokrine Tumoren wie Hypophysenadenome, Karzinoide des Gastrointestinaltraktes, Phäochromozytome, das medulläre Schilddrüsenkarzinom und das kleinzellige Bronchialkarzinom, aber auch Tumoren des Nervensystems (Astrozytome, Meningeome), maligne Lymphome, das Nierenzellkarzinom und das Mammakarzinom [72-77]. Die Entwicklung polyklonaler Antikörper gegen Peptidfragmente aller fünf bekannten SSTR erlaubt die unabhängige Darstellung der verschiedenen Subtypen mittels Immunhistochemie. Bei einer Reihe verschiedener Tumorentitäten konnte mit immunhistochemischen Methoden nachgewiesen werden, dass humane Tumoren ein differentielles SSTR-Expressionsmuster aufweisen [63-65, 76, 78-80]. Eine Übersicht hierzu gibt Tabelle 5-1.

Diese Untersuchung zeigt, dass HCCs ebenfalls eine differentielle, individual-spezifische Expression der verschiedenen SSTR-Subtypen aufweisen. Heterogene Expressionsmuster und -dichte und die in einigen Tumoren gefundene fokale Expression von SSTR in sonst SSTR-negativem Tumorgewebe könnte einer der Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse der klinischen Studien zur Anwendung von Somatostatinanaloga im HCC sein (vgl. Tabelle 2-3). Auch innerhalb einzelner Studien waren die Ergebnisse gelegentlich uneinheitlich. Samonakis et al. [51] berichten, dass die Teilnehmer ihrer Studie unterschiedlich auf eine Therapie mit Somatostatinanaloga ansprachen. Einige Patienten blieben in ihrem Krankheitsverlauf über Monate hinweg bemerkenswert stabil, während anderen Patienten einen rasch progredienten und früh fatalen Krankheitsverlauf erfuhren. Als Grund hierfür, so die Autoren, sei das Vorhandensein oder Fehlen funktionsfähiger SSTR auf den Tumorzellen anzunehmen.

Tabelle 5-1: Differentielle Expression von Somatostatinrezeptoren in humanen Tumoren. Nachweis mittels immunhistochemischer Verfahren. Referenzen: [63-65, 76, 78-80]

Tumor	Arbeitsgruppe	Fälle	SSTR				
			1	2	3	4	5
Gastrinom	Kulaksiz et al.	33	30%	100%	79%	n. u.	76%
Insulinom	Kulaksiz et al.	36	31%	58%	78%	n. u.	78%
Karzinoid	Kulaksiz et al.	35	37%	86%	71%	n. u.	83%
Ovarialkarzinom	Schulz et al.	47	19%	28%	42%	17%	21%
Zervixkarzinom	Schulz et al.	21	38%	57%	43%	0%	0%
Endometriumkarzinom	Schulz et al.	28	32%	39%	43%	4%	4%
Mammakarzinom	Schulz et al.	33	52%	48%/ 67%	48%	n. u.	n. u.
Meningeom	Schulz et al.	40	5%	70%/ 15%	25%	28%	11%
Bronchialkarzinom	Papotti et al.	25	n. u.	68%	24%	n. u.	20%
Medulläres Schilddrüsenkarzinom	Papotti et al.	51	49%	3%	47%	4%	57%
Pankreaskarzinom	Fjallskog et al.	28	70%	90%	50%	90%	50%
Medulloblastom	Guyotat et al.	15	n. u.	100%	n. u.	n. u.	n. u.

n. u. – nicht untersucht; ¹SSTR2A / SSTR2B

5.2 Immunhistochemie ist eine verlässliche Methode zum SSTR-Nachweis formalinfixierter HCC-Biopsate

RT-PCR ist, verglichen mit immunhistochemischen Verfahren, die sensitivere Methode zum Nachweis der Rezeptorexpression, kann aber keine Aussagen zur zellulären Lokalisation treffen. Zwischen Tumor und umgebendem Gewebe wird nicht

differenziert, bzw. es muss bei der Probengewinnung sehr genau darauf geachtet werden, dass ausschließlich Tumorgewebe untersucht wird. Diese Entscheidung ist makroskopisch am Resektat oftmals schwierig. Bei den Untersuchungen zu dieser Arbeit stellte sich das umgebende, in vielen Fällen zirrhotisch veränderte Lebergewebe häufig in der Immunfärbung SSTR-positiv dar. Ein Befund, der sich mit den Ergebnissen von Reynaert et al. deckt, die in einer kleinen Anzahl untersuchter Proben SSTR in zirrhotischem Gewebe (und ebenfalls in HCCs, aber nicht in normalen Hepatozyten) mittels Immunhistochemie nachweisen konnten [81]. Dies könnte bei RT-PCR-Untersuchungen zu falsch-positiven Resultaten führen. Ebenso kann durch den Nachweis des mRNA-Transkripts keine Aussage darüber getroffen werden, ob tatsächlich auf Proteinebene ein funktionsfähiger Rezeptor hergestellt und in die Zellmembran überführt wird. Weiterhin ist durch RT-PCR eine quantifizierende Beurteilung und ein Nachweis fokaler Expression im Tumor nicht möglich.

Papotti et al. fanden bei einer vergleichenden immunhistochemischen und RT-PCR-Analyse der SSTR-Expression von gastrointestinalen und pankreatischen endokrinen Tumoren in über 90 % der untersuchten Fälle eine positive Korrelation beider Methoden [82]. Dieses Ergebnis konnte bei der Untersuchung von Lungentumoren durch die gleiche Arbeitsgruppe bestätigt werden [76].

In Vorarbeiten zu dieser Studie wurde bei der Untersuchung weniger Tumorproben in unserem Labor mittels RT-PCR und vergleichender Immunhistochemie in der Mehrzahl übereinstimmende Ergebnisse erzielt. In einigen Fällen fand sich ein mRNA-Transkript ohne entsprechende immunhistochemische Darstellung. Neben der geringeren Sensitivität der Immunhistochemie könnte ein weiterer Grund sein, dass in Tumoren möglicherweise Mutationen der SSTR-Gene auftreten, die eine Translation der mRNA in ein Rezeptorprotein verhindern, die Rezeptorkonformation verändern oder mit dem posttranslationalen Prozessing des Rezeptors interferieren und somit den Rezeptornachweis durch eine immunhistochemische Darstellung verhindern.

Schwierigkeiten bereitet gelegentlich die Interpretation der Untersuchungsergebnisse, vor allem bei starker unspezifischer Hintergrundfärbung und bei fokaler An-

färbung. Zusätzlich existieren bislang keine einheitlichen Interpretationskriterien für die histologische Beurteilung [76]. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Zuverlässigkeit der Untersuchung zu gewährleisten, indem Auswertung und Beurteilung zunächst durch zwei Begutachter in mehreren Durchgängen unabhängig voneinander durchgeführt und in einem zweiten Schritt abweichende Ergebnisse noch einmal gemeinsam beurteilt und bis zur Konsensfindung diskutiert wurden.

Immunhistochemie ist ein zuverlässiges Verfahren zum Nachweis von SSTR in Tumoren, das bereits in zahlreichen Arbeiten angewendet wurde (siehe Tabelle 5-1). Mehrere Arbeiten fanden beim Vergleich von Immunhistochemie mit anderen Nachweisverfahren übereinstimmende Resultate. Die Spezifität der verwendeten Antikörper wurde anhand der selektiven Darstellung endokriner SSTR-exprimierender Inselzellen im Pankreasgewebe und dem vollständigen Blockieren der Antikörper bei der Präabsorption mit dem entsprechenden Antigen gezeigt.

5.3 SSTR vermitteln zytostatische und zytotoxische Effekte

Der Einsatz von Somatostatinanaloga zur symptomatischen Therapie der Hypersekretion bei hormonproduzierenden Tumoren [83, 84], brachte die Erkenntnis, das SSTR nicht nur eine Inhibition der Hormonsekretion vermitteln, sondern darüber hinaus auch eine antiproliferative Wirkung mit Tumorreduktion erzielt werden kann [54, 85]. Diese Effekte konnten sowohl durch Zellkulturuntersuchungen *in vitro*, als auch *in vivo* nachgewiesen werden [43, 86]. Experimentell in Nacktmäuse implantierte Pankreas- und Kolonkarzinome, sowie kleinzellige Bronchialkarzinome können durch Administration von Somatostatinanaloga in ihrem Wachstum gehemmt werden [87]. Bei etwa 50 % der Akromegaliepatienten mit Hypophysenadenom, die mit Somatostatinanaloga symptomatisch zur Suppression der Wachstumshormonsekretion behandelt wurden, war eine Tumorreduktion feststellbar [88].

Dieser hemmende Effekt von SSTR auf die Zellproliferation von Tumoren beruht auf zytostatischen (Zellzyklusarrest) und zytotoxischen (Apoptoseinduktion) Me-

chanismen und wird entweder direkt, über auf den Tumorzellen exprimierte SSTR oder indirekt über SSTR auf Nichttumorzellen vermittelt. Dies führt zur Hemmung der Sekretion von Hormonen und Wachstumsfaktoren, die verstärkend auf das Wachstum von Tumoren wirken, zur Angiogeneseinhibition [89] oder Modulation der Immunantwort [4, 42].

SSTR vermitteln zytostatische, antiproliferative Effekte über eine ganze Reihe von intrazellulären Signaltransduktionswegen, wobei die Mitogen-aktivierte-Proteinkinase-(MAPK-)-Kaskade eine Hauptrolle spielt. Die MAPK-Kaskade besitzt eine wichtige Funktion in der Signaltransduktion durch Wachstumsfaktoren wie z. B. PDGF (platelet derived growth factor) zur Steuerung von Zellproliferation, -entwicklung und -differenzierung, sowie der Regulation des Zellzyklus [90]. Ausgangspunkt der MAPK-Kaskade ist das G-Protein Ras. Dieses geht bei Aktivierung in die aktivierte, GTP-bindende Form über. Ras-GTP interagiert nun mit der Serin-Threonin-Kinase Raf, die wiederum Aktivator der MAP-Kinase-Kinase (MEK) ist. Diese Threonin-Tyrosin-Kinase phosphoryliert schließlich MAPK, das verschiedene Transkriptionsfaktoren als Substrat besitzt.

Für alle SSTR konnte mittlerweile ein modulierender Einfluss auf die MAPK-Aktivität nachgewiesen werden [4]. In Neuroblastomzellen führt das Somatostatinanalogon Lanreotid (BIM 23014), das eine hohe Affinität für SSTR2 besitzt zu einer Inhibition der MAPK-Aktivität und der Zellproliferation [91]. SSTR3 vermittelt in transfizierten NIH3T3-Zellen eine MAPK-Inhibition durch Inaktivierung von Raf [92]. Im Gegensatz hierzu führt Somatostatin in CHO-K1-Zellen über den SSTR1-Rezeptor zu einer MAPK-Aktivierung mit konsekutiver Expression von p21^{cip1}. p21^{cip1} zählt zur Gruppe der Cyclin-abhängigen-Proteinkinasen, die einen hemmenden Einfluss auf den Zellzyklus besitzen [93, 94]. Ein weiterer Regulator des Zellzyklus ist das Retinoblastom-(Rb-)-Protein. Hypophosphoryliertes Rb bindet Transkriptionsfaktoren, die für den Übergang der Zellen in die S-Phase der Mitose verantwortlich sind und führt zur Akkumulation von Zellen in der G1-Phase [95]. In einem Zellkultursystem mit CHO-K1-Zellen konnte gezeigt werden, dass Somatostatin über verschiedene Rezeptoren zu einer Rb-Induktion führt (SSTR5>SSTR2>SSTR4>SSTR1), wodurch es zu einer Zellzyklus-Inhibition

kommt. Eine Mitbeteiligung des MAPK-Signaltransduktionsweges wird hierbei diskutiert [96].

Neben der Vermittlung von zytostatischen Effekten sind SSTR auch in der Lage Apoptose zu induzieren, wie zuerst an MCF7-Zellen gezeigt wurde, die mit Octreotid behandelt wurden [97]. Da MCF-7-Zellen mehrere SSTR exprimieren, war eine genauere Zuordnung zu einem Subtyp nicht möglich. In CHO-K1-Zellen, die jeweils einen rekombinanten SSTR exprimierten, ließ sich ein apoptotischer Effekt durch Stimulation des SSTR3-Subtyps auslösen. Hierbei wurde eine Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 und des proapoptotischen Proteins bax beobachtet [98]. Beides sind Schlüsselmoleküle bei der Induktion der Apoptose.

Zwei zentrale intrazelluläre Signalkaskaden sind entscheidend an der Apoptoseauslösung beteiligt. Der extrinsische Weg läuft über Rezeptoren der Todesrezeptorenfamilie (engl. death receptors) und besitzt unter anderem TNF α als Ligand. DNA-Schädigung löst Apoptose über einen weiteren, zellintrinsischen Weg aus, bei dem es zur Aktivierung von Proteinen der bcl-2-Familie und der bax-Superfamilie kommt. Beide Signaltransduktionswege münden schließlich in die Aktivierung von Cysteinproteasen, den sogenannten Caspasen, die über eine Kaskade von verschiedenen Proteolyseraktionen letztendlich die Apoptose der Zelle bewirken [99].

Für den SSTR2-Rezeptor konnte gezeigt werden, dass in menschlichen Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3-Zellen) Apoptose über SSTR2 ausgelöst wird. Hierbei kommt es zu einer Beteiligung beider Signaltransduktionswege, einerseits durch Hochregulation der Expression von TNF α -Rezeptoren, andererseits durch verminderte Expression des antiapoptotischen Proteins bcl-2 des intrinsischen Weges [100]. Wie in einer anderen Arbeit beschrieben, ließ sich ebenfalls über SSTR2 in einem Zellkultursystem mit HL-60-Zellen Apoptose auslösen [101].

Neben diesen direkten, durch SSTR auf den Tumorzellen vermittelten Wirkungen wurden ebenfalls indirekte Effekte von Somatostatinanaloga auf Tumorzellen, die über keine SSTR verfügen nachgewiesen. Bei Tumormodellen des Kaposi-Sarkoms, das selbst keine SSTR exprimiert zeigte sich ein antiproliferativer Effekt

nach Gabe von SST. SST-behandelte Tumoren wiesen histologisch eine verminderte Vaskularisation auf. SST wirkte in vitro hemmend auf die Proliferation von Endothelzellen [89]. Das Vorhandensein hoher Rezeptordichten bei peritumoralen Gefäßen ist beschrieben [102]. Bei SSTR-negativen Chondrosarkomen wurde eine Wachstumsinhibition durch Hemmung von GH, IGF-1 und Insulin beschrieben [103]. Über den antiproliferativen Beitrag und die Bedeutung indirekte Effekte beim Einsatz von Somatostatinanaloga in der Therapie des HCC besteht noch Unklarheit.

5.4 Die Expression zellzyklusarrest- und apoptosevermittelnder SSTR bildet die Rationale einer Tumorthherapie mit Somatostatinanaloga

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die SSTR-Expression in Tumoren und die Vermittlung antiproliferativer, zytostatischer und apoptoseinduzierender zytotoxischer Effekte über SSTR die Rationale für den Einsatz von Somatostatinanaloga in der Tumorthherapie darstellt. Wie weiter oben dargestellt, sind die Ergebnisse der klinischen Studien zum Einsatz von Somatostatinanaloga in der Therapie des HCC uneinheitlich (siehe auch Tabelle 2-3). Diese Arbeit zeigt, dass HCCs eine differentielle, individual-spezifische Expression der einzelnen SSTR-Subtypen mit heterogenem Rezeptorexpressionsmuster und variablem Expressionsgrad aufweisen. Dies könnte eine Erklärung für die divergente Studienlage darstellen.

Die derzeit in der Tumorthherapie eingesetzten Somatostatinanaloga wie Octreotid besitzen die höchste Affinität für den SSTR2-Subtyp, gefolgt von SSTR5 und SSTR3 [16]. Es besteht keine signifikante Affinität zu SSTR1 und SSTR4. Rabinowitz et al. konnten bei in-vivo-Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Octreotid in einer Untergruppe von 63 % der 8 untersuchten Patienten mit HCC ein positives Resultat mit fokalem Tracer-Uptake erzielen [104]. Genau diese Untergruppe könnte von einer Therapie mit Somatostatinanaloga besonders profitieren. In einer der Therapiestudien zum Einsatz von Somatostatinanaloga beim HCC wurden lediglich Patienten mit zuvor durchgeführter positiver in-vivo-Octreotid-Szintigraphie in die Behandlungsgruppe eingeschlossen [53]. Dies war in 78,57% der untersuchten Patienten mit HCC der Fall. Im Vergleich zu den übr-

gen Studien (vgl. Tabelle 2-3) war das Resultat positiv hinsichtlich einer Verlängerung der mittleren Überlebensdauer und einer Verbesserung der Lebensqualität. Eine Reduktion der Tumormasse konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

5.5 Mögliche Verbesserung einer HCC-Therapie durch Somatostatinanaloga mit neuartigem Rezeptorprofil

In dieser Untersuchung war lediglich bei 38 % der Tumorproben SSTR2 nachweisbar, während SSTR5 und SSTR3 mit 74 %, bzw. 68 % sehr viel häufiger exprimiert wurden. Ein spezifisches Targeting genau dieser Subtypen könnte die HCC-Therapie noch effektiver gestalten. Zwei Vorgehensweisen sind hierbei denkbar. Eine Dosissteigerung, im Fall von Analoga wie Octreotid, mit hoher Affinität für SSTR2 und in geringerer Masse für SSTR5 und SSTR3, würde die Zahl der besetzten SSTR5- und SSTR3-Rezeptormoleküle erhöhen. Eine weitere Möglichkeit wäre der Einsatz neuer Verbindungen, mit höherer Affinität zu SSTR5 und SSTR3.

Ein Beispiel für eine solche Verbindung ist SOM230, das neben einer langen Halbwertszeit und guter Verträglichkeit im Tierexperiment eine hohe Affinität zu SSTR1, SSTR2, SSTR3 und SSTR5 aufweist. Im Vergleich zu Octreotid ist die Affinität zu SSTR1 und SSTR5 30- bis 40-fach größer [105]. In einer 2004 erschienenen Arbeit konnte SOM230 die Proliferation von humanen Endothelzellen (HUVECs = human umbilical vein endothelial cells) signifikant hemmen, wohingegen Octreotid keinen Effekt auf das Wachstum dieser Zellen besaß [106]. In einer randomisierten, doppelblinden proof-of-concept-Studie bei Akromegalie-Patienten zeigte SOM-230 im Vergleich zu Octreotid bezüglich der GH-Inhibition eine längere Halbwertszeit und eine geringere interindividuelle Variabilität bei insgesamt aber niedrigerer Wirkpotenz [107]. Weitere alternative Analoga sind BIM-23268, mit hoher Affinität für SSTR5, sowie BIM-23244, das SSTR2- und SSTR5-spezifisch wirkt [46]. KE-108 ist ein SSTR-Agonist mit hoher Affinität zu allen fünf Somatostatinrezeptoren [108, 109]. Zur klinischen Anwendung zugelassen sind derzeit neben Octreotid allerdings nur Lanreotid und Valpreotid.

5.6 Bei HCCs ist die SSTR-Expression unabhängig von klinischen und histologischen Parametern

Bei den 50 untersuchten Tumorproben fand sich kein Zusammenhang zwischen SSTR-Expression und dem Tumorstadium, -grading oder dem histologischen Typ. Klinische Parameter wie zugrundeliegende Leberzirrhose, begleitende Infektion mit dem Hepatitis-B- oder Hepatitis-C-Virus oder chronischer Alkoholabusus hatten ebenfalls keinen Einfluss auf die Rezeptorexpression.

Dies deckt sich mit Beobachtungen, die bei der Untersuchung von neuroendokrinen Tumoren des gastroentero-pankreatischen Systems gemacht wurden. Dort war ebenfalls keine Assoziation zwischen SSTR-Expression sowie Geschlecht, Lebensalter, Tumorlokalisierung, -größe, -stadium und klinischem Verlauf feststellbar [82]. Ähnliche Resultate ergaben Arbeiten zu ovariellen Tumoren [78], Mammakarzinomen [63], Zervixkarzinomen und Endometriumkarzinomen [79], als auch die immunhistochemische Untersuchung medullärer Schilddrüsenkarzinomen [80]. In einer anderen Untersuchung [110], bei der Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom mittels in-vivo-Octreotid-Szintigraphie untersucht wurden, ging allerdings ein positiver SSTR-Besatz mit guter Tumordifferenzierung einher. Bei gastroentero-pankreatischen Adenokarzinomen hingegen fand sich eine inverse Korrelation zwischen Tumorstadium und SSTR2-Expression [111].

Kein klinischer oder histologischer Parameter in dieser Arbeit war imstande, ein bestimmtes Expressionsmuster der SSTR in HCCs vorherzusagen. Geht man davon aus, dass ein therapeutisches Ansprechen auf Somatostatinanaloga von der Art der exprimierten SSTR-Subtypen und der Expressionsdichte abhängig ist, so lässt sich alleine aufgrund von klinischen und histologischen Parametern kein Rückschluss das Expressionsmuster, sowie auf einen möglichen Therapieerfolg ziehen.

Das untersuchte Patientenkollektiv entspricht im wesentlichen einem typischen deutschen HCC-Kollektiv. Deutschland gehört zu den Ländern mit niedriger Inzidenz des HCC. Hierzulande beträgt das Verhältnis Männer:Frauen in der Geschlechterverteilung 4:1 und lag in dieser Studie bei 82 %:18 %. Etwa 75 % aller HCC-Patienten haben eine zugrundeliegende Leberzirrhose (66 % in der vorliegenden Arbeit), die den wichtigsten Risikofaktor für die Entwicklung eines HCC

darstellt. Auch in Deutschland sind virale Hepatitiden stark positiv mit dem HCC korreliert. 35 % der Patienten mit HCC sind mit dem Hepatitis-B-, 27 % mit dem Hepatitis-C-Virus infiziert [112]. Bei lediglich 10 % der Patienten dieser Arbeit war eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus, bei 22 % eine Hepatitis-C-Infektion nachweisbar. Eine Ursache könnte darin liegen, dass nicht in allen Fällen der Infektionsstatus bekannt war.

Einschränkend muss noch bemerkt werden, dass ein gewisser Selektions-Bias durch die Auswahl der Präparate nicht ausgeschlossen werden kann. Untersucht wurden lediglich Tumorproben aus OP-Präparaten. Präparate von Stanzbiopsien wurden aus technischen Gründen nicht in die Untersuchung aufgenommen. Eine Operation mit dem Ziel einer Leberteilresektion oder –transplantation wird aber nur in Frühstadien und bei noch operablen Patienten durchgeführt, so frühe Tumorstadien möglicherweise überrepräsentiert sind. 66 % der hier untersuchten Tumoren entsprechen einem Stadium pT1 bzw. pT2.

5.7 Abschlussbemerkung und Ausblick

Diese Arbeit gibt Hinweise für ein differentielles, individual-spezifisches Rezeptor-expressionsmuster mit variabler -expressionsdichte. Mit insgesamt 12 verschiedenen Expressionsmustern ist die Bandbreite verschiedener Rezeptorkonstellationen groß. Bei 20 % der Tumoren konnte in der immunhistochemischen Darstellung kein einziger Rezeptorsubtyp nachgewiesen werden. In einigen Tumoren ließen sich lediglich fokal SSTRs darstellen. All diese Faktoren könnten einen Einfluss auf den antiproliferativen Effekt einer Therapie mit Somatostatinanaloga besitzen und eine Erklärung für die teilweise kontroversen Ergebnisse der veröffentlichten Studien zum Einsatz von Somatostatinanaloga beim HCC geben.

Weitere Studien sind notwendig, um festzustellen, welche spezifischen Rezeptor-expressionsmuster in HCCs mit einem günstigen Ansprechen bei der Therapie mit Somatostatinanaloga korrelieren. Im Idealfall fände dann eine Bestimmung des Rezeptorstatus vor Therapiebeginn statt, um selektiv Patienten mit einem geeigneten Rezeptorprofil auszuwählen, die in besonderem Masse von einer Therapie mit Somatostatinanaloga profitieren würde. Dies könnte beispielsweise durch immunhistochemische Verfahren anhand von Feinnadelbiopsien geschehen. Im-

munhistochemie gehört zu den Routineanwendungen in der Pathologie und ist, sobald ein zuverlässiges Nachweisprotokoll erstellt ist, vergleichsweise einfach und kostengünstig durchführbar.

6. Zusammenfassung

Hepatozelluläre Karzinome zählen weltweit zu den malignen Tumoren, die in ihrer Inzidenz am stärksten zunehmen. Bei Diagnosestellung liegt das HCC in vielen Fällen bereits in einem inoperablen Tumorstadium vor, so dass alternative therapeutische Konzepte herangezogen werden müssen. Somatostatinanaloga vermitteln antiproliferative Effekte über die Expression unterschiedlicher Somatostatinrezeptoren (SSTR1-5) im Tumorgewebe. Seit einigen Jahren werden Somatostatinanaloga in der Therapie fortgeschrittener HCC eingesetzt. Die Ergebnisse verschiedener klinischer Studien hierzu sind uneinheitlich und werden teilweise kontrovers beurteilt. Bislang liegen kaum Daten über die Inzidenz der einzelnen SSTR im HCC vor, obwohl dies eine wichtige Grundlage für das Verständnis der Therapie und für die Therapieentscheidung darstellt.

In dieser Arbeit wurden 50 HCCs immunhistochemisch hinsichtlich der Expression der fünf verschiedenen SSTR-Subtypen untersucht und der Rezeptorstatus dann mit klinischen und histopathologischen Daten verglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass HCCs ein differentielles, individual-spezifisches Expressionsmuster mit variablem SSTR-Expressionslevel aufweisen. SSTR5 fand sich in 74 % der Tumorproben, gefolgt von SSTR3 (68 %), SSTR1 (48 %), SSTR2 (38 %) und SSTR4 (0 %). Eine signifikante Korrelation zwischen SSTR-Expression und Tumorstadium, -differenzierung, histologischem Typ und zugrundeliegender Lebererkrankung war nicht nachweisbar.

Aufgrund des individuellen SSTR-Expressionsmusters und des Expressionslevels kann die generelle Wahrscheinlichkeit des Ansprechens auf eine Therapie mit Somatostatinanaloga abgeleitet werden. Basierend auf der Analyse des SSTR-Expression wird die selektive Therapie von HCCs mit geeignetem Rezeptorprofil möglicherweise zu einer Verbesserung des Therapieergebnisses führen.

7. Abbildungsverzeichnis

7.1 Tabellen

Tabelle 2-1: Strukturelle Daten der fünf humanen SSTR.	5
Tabelle 2-2: Mittlere Überlebenszeit bei Anwendung verschiedener systemischer Therapien	9
Tabelle 2-4: Studienlage zur Therapie mit Somatostatinanaloga bei HCC	11
Tabelle 3-1: TNM-Klassifikation des HCC	18
Tabelle 3-3: Histologisches Grading nach Edmondson und Steiner.....	19
Tabelle 3-5: Charakteristika der Patienten und Tumore	21
Tabelle 4-1: SSTR-Rezeptorexpressionsmuster	29
Tabelle 4-2: SSTR-Expression in HCCs.....	30
Tabelle 4-3: SSTR-Expression in HCCs (Fortsetzung)	31
Tabelle 4-4: Korrelation zwischen SSTR-Expression und Patientengeschlecht...	34
Tabelle 4-5: Korrelation zwischen SSTR-Expression und Tumorstadium (pT).....	35
Tabelle 4-6: Korrelation zwischen SSTR-Expression und histologischem Grading	35
Tabelle 4-7: Korrelation zwischen SSTR-Expression und histologischem Typ. ...	35
Tabelle 4-8: Korrelation zwischen SSTR-Expression und Hepatitis-B-Infektion...	35
Tabelle 4-9: Korrelation zwischen SSTR-Expression und Hepatitis-C-Infektion...	36
Tabelle 4-11: Korrelation zwischen SSTR-Expression und vorliegender Leberzirrhose.	36
Tabelle 4-11: Korrelation zwischen SSTR-Expression und vorliegendem Alkoholabusus.....	36
Tabelle 5-1: Differentielle Expression von Somatostatinrezeptoren in humanen Tumoren.....	41

7.2 Abbildungen

Abbildung 3-1: Die EnVision™-Methode	23
Abbildung 4-1: Unterschiedliche SSTR-Expressionsmuster und –dichte in HCC	33
Abbildung 4-2: Immunhistochemischer Nachweis der SSTR-Expression in den Inselzellen des humanen Pankreas	37
Abbildung 4-4: Immunhistochemischer Nachweis der SSTR-Expression in HCC und Hemmung der Anfärbung durch Präabsorption mit dem Antigenpeptid.	39

8. Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase
CRH	corticotropin releasing hormone
CT	Computertomographie
DAB	3,3-Diaminobenzidin
GH	Wachstumshormon
GIP	gastric inhibitory polypeptide
GTP	Guanosintriphosphat
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Salzsäure
IGF	insulin-like growth factor
LSAB	Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode
MAPK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
MEK	MAP-Kinase-Kinase
mRNA	Boten-RNA
NaOH	Natronlauge
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDGF	platelet derived growth factor
PEI	Perkutane Ethanolinjektion
Rb	Retinoblastom(-Protein)
RFTA	Radiofrequenzthermoablation
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SABC	Streptavidin-Biotin-Komplex
SST	Somatostatin
SSTR	Somatostatinrezeptor
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TNF	Tumornekrosefaktor
TRH	thyrotropin releasing hormone
TSH	Thyreostimulierendes Hormon
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
VIP	vasoaktives intestinales Polypeptid

9. Literaturverzeichnis

1. Brazeau, P., et al., *Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone*. Science, 1973. **179**(68): p. 77-9.
2. Montminy, M.R., et al., *Primary structure of the gene encoding rat prepro-somatostatin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(11): p. 3337-40.
3. Patel, Y.C., et al., *The somatostatin receptor family*. Life Sci, 1995. **57**(13): p. 1249-65.
4. Patel, Y.C., *Somatostatin and its receptor family*. Front Neuroendocrinol, 1999. **20**(3): p. 157-98.
5. Fehmann, H.C. and R. Arnold, *[Molecular biology, pharmacology and signal transduction of 5 cloned human somatostatin receptors]*. Z Gastroenterol, 1996. **34**(11): p. 767-74.
6. Sonnenberg, G.E., et al., *Effect of somatostatin on splanchnic hemodynamics in patients with cirrhosis of the liver and in normal subjects*. Gastroenterology, 1981. **80**(3): p. 526-32.
7. Karalis, K., et al., *Somatostatin analogues suppress the inflammatory reaction in vivo*. J Clin Invest, 1994. **93**(5): p. 2000-6.
8. Hejna, M., M. Schmidinger, and M. Raderer, *The clinical role of somatostatin analogues as antineoplastic agents: much ado about nothing?* Ann Oncol, 2002. **13**(5): p. 653-68.
9. Patel, Y.C., *Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes*. J Endocrinol Invest, 1997. **20**(6): p. 348-67.
10. Evans, C., et al., *Cloning of a delta opioid receptor by functional expression*. Science, 1992. **258**: p. 1952-1955.
11. Reisine, T., et al., *Splice variant of the somatostatin receptor 2 subtype, somatostatin receptor 2B, couples to adenylyl cyclase*. Mol Pharmacol, 1993. **44**(5): p. 1016-20.
12. Reisine, T. and G.I. Bell, *Molecular biology of somatostatin receptors*. Endocr Rev, 1995. **111**: p. 1394-1396.
13. Reubi, J.C., et al., *Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands*. Eur J Nucl Med, 2001. **28**(7): p. 836-46.
14. Jenkins, S.A., et al., *Somatostatin analogs in oncology: a look to the future*. Chemotherapy, 2001. **47 Suppl 2**: p. 162-96.
15. Kumar, U., et al., *Subtype-selective expression of the five somatostatin receptors (hSSTR1-5) in human pancreatic islet cells: a quantitative double-label immunohistochemical analysis*. Diabetes, 1999. **48**(1): p. 77-85.
16. Patel, Y.C. and C.B. Srikant, *Subtype selectivity of peptide analogs for all five cloned human somatostatin receptors (hsstr 1-5)*. Endocrinology, 1994. **135**(6): p. 2814-7.
17. Sheppard, M., et al., *Metabolic clearance and plasma half-life disappearance time of endogenous somatostatin in man*. J Clin Endocrinol Metab, 1979(48): p. 50-53.
18. Lamberts, S.W., et al., *Octreotide*. N Engl J Med, 1996. **334**(4): p. 246-54.
19. Bauer, W., et al., *SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action*. Life Sci, 1982. **31**(11): p. 1133-40.
20. Kuhn, J., et al., *Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of a long acting formulation of the new somatostatin analogue, lanreotide, in normal healthy volunteers*. Br J Clin Pharmacol, 1994. **38**: p. 213-219.

21. Rubin, J., et al., *Octreotide acetate long-acting formulation versus open-label subcutaneous octreotide acetate in malignant carcinoid syndrome*. J Clin Oncol, 1999. **17**: p. 600-606.
22. Lancranjan, I., et al., *Sandostatin LAR: a promising therapeutic tool in the management of acromegalic patients*. Metabolism, 1996. **45**: p. 67-71.
23. El-Serag, H., *Hepatocellular carcinoma - An epidemiologic view*. J Clin Gastroenterol, 2002. **35**(5 Suppl 2): p. S72-8.
24. McGlynn, K.A., et al., *International trends and patterns of primary liver cancer*. Int J Cancer, 2001. **94**(2): p. 290-6.
25. El-Serag, H.B. and A.C. Mason, *Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States*. N Engl J Med, 1999. **340**(10): p. 745-50.
26. Rocken, C. and S. Carl-McGrath, *Pathology and pathogenesis of hepatocellular carcinoma*. Dig Dis, 2001. **19**(4): p. 269-78.
27. Beasley, R., *Hepatitis B virus: the major etiology of hepatocellular carcinoma*. Cancer, 1988. **61**: p. 1942-56.
28. Donato, F., P. Boffetta, and M. Puoti, *A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma*. Int J Cancer, 1998. **75**: p. 347-54.
29. Kowdley, K.V., *Iron, hemochromatosis, and hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2004. **127**(5 Suppl 1): p. S79-86.
30. Craig, J.R., et al., *Fibrolamellar carcinoma of the liver: a tumor of adolescents and young adults with distinctive clinico-pathologic features*. Cancer, 1980. **46**(2): p. 372-9.
31. El-Serag, H.B., A.C. Mason, and C. Key, *Trends in survival of patients with hepatocellular carcinoma between 1977 and 1996 in the United States*. Hepatology, 2001. **33**(1): p. 62-5.
32. Befeler, A.S. and A.M. Di Bisceglie, *Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment*. Gastroenterology, 2002. **122**(6): p. 1609-19.
33. Figueras, J., et al., *[Surgical treatment of hepatocellular carcinoma. Long term results]*. Med Clin (Barc), 2002. **118**(11): p. 410-4.
34. Llovet, J.M., J. Fuster, and J. Bruix, *Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation*. Hepatology, 1999. **30**(6): p. 1434-40.
35. Hanazaki, K., et al., *Hepatic resection for large hepatocellular carcinoma*. Am J Surg, 2001. **181**(4): p. 347-53.
36. Treiber, G., *Systemic treatment of hepatocellular carcinoma*. Dig Dis, 2001. **19**(4): p. 311-23.
37. Kaczynski, J., G. Hansson, and S. Wallerstedt, *Metastases in cases with hepatocellular carcinoma in relation to clinicopathologic features of the tumor. An autopsy study from a low endemic area*. Acta Oncol, 1995. **34**(1): p. 43-8.
38. Lencioni, R., A. Paolicchi, and C. Bartolozzi, *[Percutaneous alcohol administration for hepatocarcinoma: long-term results]*. Radiol Med (Torino), 1997. **94**(1-2): p. 8-13.
39. Lencioni, R.A., et al., *Small hepatocellular carcinoma in cirrhosis: randomized comparison of radio-frequency thermal ablation versus percutaneous ethanol injection*. Radiology, 2003. **228**(1): p. 235-40.
40. Llovet, J.M., et al., *Increased risk of tumor seeding after percutaneous radiofrequency ablation for single hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2001. **33**(5): p. 1124-9.

41. Yuen, M.F., et al., *Transarterial chemoembolization for inoperable, early stage hepatocellular carcinoma in patients with Child-Pugh grade A and B: results of a comparative study in 96 Chinese patients*. Am J Gastroenterol, 2003. **98**(5): p. 1181-5.
42. Lamberts, S.W., W.W. de Herder, and L.J. Hofland, *Somatostatin analogs in the diagnosis and treatment of cancer*. Trends Endocrinol Metab, 2002. **13**(10): p. 451-7.
43. Schally, A.V., *Oncological applications of somatostatin analogues*. Cancer Res, 1988. **48**(24 Pt 1): p. 6977-85.
44. Scarpignato, C. and I. Pelosini, *Somatostatin analogs for cancer treatment and diagnosis: an overview*. Chemotherapy, 2001. **47**(suppl 2): p. 1-29.
45. Lamberts, S.W., J.W. Koper, and J.C. Reubi, *Potential role of somatostatin analogues in the treatment of cancer*. Eur J Clin Invest, 1987. **17**(4): p. 281-7.
46. Lamberts, S.W., A.J. van der Lely, and L.J. Hofland, *New somatostatin analogs: will they fulfil old promises?* Eur J Endocrinol, 2002. **146**: p. 701-705.
47. Raderer, M., et al., *Successful treatment of an advanced hepatocellular carcinoma with the long-acting somatostatin analog lanreotide*. Am J Gastroenterol, 1999. **94**(1): p. 278-279.
48. Kouroumalis, E., et al., *Treatment of hepatocellular carcinoma with octreotide: a randomised controlled study*. Gut, 1998. **42**(3): p. 442-7.
49. Raderer, M., et al., *Treatment of hepatocellular cancer with the long acting somatostatin analog lanreotide in vitro and in vivo*. Int J Oncol, 2000. **16**(6): p. 1197-201.
50. Rabe, C., et al., *[Clinical outcome of a cohort of 63 patients with hepatocellular carcinoma treated with octreotide.]* Z Gastroenterol, 2002. **40**(6): p. 395-400.
51. Samonakis, D.N., et al., *Treatment of hepatocellular carcinoma with long acting somatostatin analogues*. Oncol Rep, 2002. **9**(4): p. 903-7.
52. Yuen, M.F., et al., *A randomized placebo-controlled study of long-acting octreotide for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2002. **36**(3): p. 687-91.
53. Dimitroulopoulos, D., et al., *The role of sandostatin LAR in treating patients with advanced hepatocellular cancer*. Hepatogastroenterology, 2002. **49**(47): p. 1245-50.
54. Lamberts, S.W., et al., *Long-term treatment of acromegaly with the somatostatin analogue SMS 201-995*. N Engl J Med, 1985. **313**: p. 1576-80.
55. Krenning, E., D. Kwekkeboom, and S. Pauwels, *Somatostatin receptor scintigraphy*. Nucl Med Ann, 1995. **1**: p. 1-50.
56. Lancranjan, I., C. Burns, and P. Grass, *Sandostatin LAR: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, efficacy and tolerability in acromegalic patients*. Metabolism, 1995. **44**(Suppl 1): p. 18-26.
57. Reubi, J.C., et al., *Regulatory peptide receptors in human hepatocellular carcinomas*. Gut, 1999. **45**(5): p. 766-74.
58. Edmondson, H.A. and P.E. Steiner, *Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies*. Cancer, 1954. **7**(3): p. 462-503.
59. Bussolati, G., et al., *Retrieved endogenous biotin: a novel marker and a potential pitfall in diagnostic immunohistochemistry*. Histopathology, 1997. **31**(5): p. 400-7.
60. Sabattini, E., et al., *The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP,*

- ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques.* J Clin Pathol, 1998. **51**(7): p. 506-11.
61. Schulz, S., et al., *Immunocytochemical localization of somatostatin receptor sst2A in the rat spinal cord and dorsal root ganglia.* Eur J Neurosci, 1998. **10**(12): p. 3700-8.
 62. Schulz, S., et al., *Localization of five somatostatin receptors in the rat central nervous system using subtype-specific antibodies.* J Physiol Paris, 2000. **94**(3-4): p. 259-64.
 63. Schulz, S., et al., *Immunocytochemical detection of somatostatin receptors sst1, sst2A, sst2B, and sst3 in paraffin-embedded breast cancer tissue using subtype-specific antibodies.* Clin Cancer Res, 1998. **4**(9): p. 2047-52.
 64. Schulz, S., et al., *Immunohistochemical determination of five somatostatin receptors in meningioma reveals frequent overexpression of somatostatin receptor subtype sst2A.* Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 1865-74.
 65. Kulaksiz, H., et al., *Identification of somatostatin receptor subtypes 1, 2A, 3, and 5 in neuroendocrine tumours with subtype specific antibodies.* Gut, 2002. **50**(1): p. 52-60.
 66. Noll, S. and S. Schaub-Kuhnen, *Praxis der Immunhistochemie.* 1. ed. 2000: Urban & Fischer Verlag München, Jena.
 67. Shi, S.R., M.E. Key, and K.L. Kalra, *Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections.* J Histochem Cytochem, 1991. **39**(6): p. 741-8.
 68. Shi, S.R., et al., *Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies.* J Histochem Cytochem, 1995. **43**(2): p. 193-201.
 69. Leong, A.S., *Microwaves in diagnostic immunohistochemistry.* Eur J Morphol, 1996. **34**(5): p. 381-3.
 70. Portela-Gomes, G.M., et al., *Expression of the five somatostatin receptor subtypes in endocrine cells of the pancreas.* Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2000. **8**(2): p. 126-132.
 71. Burry, R.W., *Specificity controls for immunocytochemical methods.* J Histochem Cytochem, 2000. **48**(2): p. 163-6.
 72. Reubi, J.C., et al., *Distribution of somatostatin receptors in normal and tumor tissue.* Metabolism, 1990. **39**(9 Suppl 2): p. 78-81.
 73. Reubi, J., et al., *Distribution of somatostatin receptors in normal and neoplastic human tissues: recent advances and potential relevances.* Yale J Biol Med, 1998. **70**: p. 471-79.
 74. Hofland, L.J., et al., *Immunohistochemical detection of somatostatin receptor subtypes sst1 and sst2a in human somatostatin receptor positive tumors.* J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**: p. 775-780.
 75. Kimura, N., et al., *Immunohistochemical expression of somatostatin type 2a receptor in neuroendocrine tumors.* Clin Cancer Res, 1999. **5**: p. 3483-3487.
 76. Papotti, M., et al., *Expression of somatostatin receptor types 2, 3 and 5 in biopsies and surgical specimens of human lung tumours. Correlation with preoperative octreotide scintigraphy.* Virchows Arch, 2001. **439**(6): p. 787-97.
 77. Reubi, J.C., W.H. Hacki, and S.W. Lamberts, *Hormone-producing gastrointestinal tumors contain a high density of somatostatin receptors.* J Clin Endocrinol Metab, 1987. **65**: p. 1127-1134.

78. Schulz, S., et al., *Immunohistochemical detection of somatostatin receptors in human ovarian tumors*. *Gynecol Oncol*, 2002. **84**(2): p. 235-40.
79. Schulz, S., J. Schmitt, and W. Weise, *Frequent expression of immunoreactive somatostatin receptors in cervical and endometrial cancer*. *Gynecol Oncol*, 2003. **89**(3): p. 385-90.
80. Papotti, M., et al., *Immunohistochemical detection of somatostatin receptor types 1-5 in medullary carcinoma of the thyroid*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2001. **54**(5): p. 641-9.
81. Reynaert, H., et al., *Expression of somatostatin receptors in normal and cirrhotic human liver and in hepatocellular carcinoma*. *Gut*, 2004. **53**: p. 1180-1189.
82. Papotti, M., et al., *Expression of somatostatin receptor types 1-5 in 81 cases of gastrointestinal and pancreatic endocrine tumors. A correlative immunohistochemical and reverse-transcriptase polymerase chain reaction analysis*. *Virchows Arch*, 2002. **440**(5): p. 461-75.
83. Kvols, L.K., et al., *Treatment of the malignant carcinoid syndrome. Evaluation of a long-acting somatostatin analogue*. *N Engl J Med*, 1986. **315**(11): p. 663-6.
84. Kvols, L., et al., *Treatment of metastatic islet cell carcinoma with a somatostatin analogue (SMS 201-995)*. *Ann Intern Med*, 1987. **107**: p. 162-168.
85. Arnold, R., et al., *Somatostatin analogue octreotide and inhibition of tumour growth in metastatic endocrine gastroenteropancreatic tumours*. *Gut*, 1996. **38**: p. 430-438.
86. Weckbecker, G., et al., *Antiproliferative somatostatin analogues with potential in oncology*. *Octreotide: The Next Decade*, ed. S.W. Lamberts. 1999, Bristol: Bioscientifica. 339-352.
87. Schally, A.V., et al., *Hypothalamic hormones and cancer*. *Front Neuroendocrinol*, 2001. **22**: p. 248-291.
88. Lamberts, S.W., *The role of somatostatin in the regulation of anterior pituitary hormone secretion and the use of its analogs in the treatment of human pituitary tumors*. *Endocr Rev*, 1988. **9**: p. 417-436.
89. Albini, A., et al., *Somatostatin controls Kaposi's sarcoma tumor growth through inhibition of angiogenesis*. *Faseb J*, 1999. **13**(6): p. 647-55.
90. Seger, R. and E.G. Krebs, *The MAPK signaling cascade*. *Faseb J*, 1995. **9**: p. 726-735.
91. Cattaneo, M.G., et al., *A somatostatin analogue inhibits MAP kinase activation and cell proliferation in human neuroblastoma and in human small cell lung carcinoma cell lines*. *FEBS Lett.*, 1996. **397**: p. 164-168.
92. Reardon, D.B., et al., *Activation of a protein tyrosine phosphatase and inactivation of Raf-1 by somatostatin*. *Biochem J*, 1997. **31**: p. 401-404.
93. Florio, T., et al., *Somatostatin activation of mitogen-activated protein kinase via somatostatin receptor 1 (SSTR1)*. *Mol Endocrinol*, 1999. **13**: p. 24-37.
94. Xiong, Y., et al., *p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases*. *Nature*, 1993. **366**: p. 701-704.
95. Weinberg, R.A., *The retinoblastoma protein and cell cycle control*. *Cell*, 1995. **81**: p. 323-330.
96. Sharma, K., Y.C. Patel, and C.B. Srikant, *C-terminal region of human somatostatin receptor 5 is required for induction of Rb and G1 cell cycle arrest*. *Mol Endocrinol*, 1999. **13**(1): p. 82-90.
97. Pagliacci, M.C., et al., *Inhibition of human breast cancer cell (MCF-7) growth in vitro by the somatostatin analog SMS 201-995: effects on cell cy-*

- cle parameters and apoptotic cell death. Endocrinology, 1991. 129(5): p. 2555-62.*
98. Sharma, K., Y.C. Patel, and C.B. Srikant, *Subtype-selective induction of wild-type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3. Mol Endocrinol, 1996. 10(12): p. 1688-96.*
 99. Hale, A.J., et al., *Apoptosis: molecular regulation of cell death. Eur J Biochem, 1996. 236: p. 1-26.*
 100. Guillermet, J., et al., *Somatostatin receptor subtype 2 sensitizes human pancreatic cancer cells to death ligand-induced apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(1): p. 155-160.*
 101. Teijeiro, R., et al., *Activation of human somatostatin receptor 2 promotes apoptosis through a mechanism that is independent from induction of p53. Cell Physiol Biochem, 2002. 12(1): p. 31-38.*
 102. Denzler, B. and J.C. Reubi, *Expression of somatostatin receptors in peritumoral veins of human tumors. Cancer, 1999. 85: p. 189-198.*
 103. Reubi, J.C., *A somatostatin analogue inhibits chondrosarcoma and insulinoma tumour growth. Acta Endocrinol (Copenh), 1985. 109(1): p. 108-14.*
 104. Rabinowitz, I., R. Telepak, and F.C. Lee, *Octreotide scans are positive in a subset of patients with hepatocellular carcinoma. Clin Nucl Med, 2002. 27(7): p. 499-502.*
 105. Bruns, C., et al., *SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile. Eur J Endocrinol, 2002. 146: p. 707-716.*
 106. Adams, R.L., et al., *Inhibition of endothelial proliferation by the somatostatin analogue SOM230. Clin Endocrinol (Oxf), 2004. 61(4): p. 431-436.*
 107. Ma, P., et al., *Pharmacokinetic-pharmacodynamic comparison of a novel multiligand somatostatin analog, SOM230, with octreotide in patients with acromegaly. Clin Pharmacol Ther, 2005. 78(1): p. 69-80.*
 108. Cervia, D., et al., *Binding and functional properties of the novel somatostatin analogue KE 108 at native mouse somatostatin receptors. Neuropharmacology, 2005. 48(6): p. 881-93.*
 109. Reubi, J.C., et al., *A new peptidic somatostatin agonist with high affinity to all five somatostatin receptors. Eur J Pharmacol, 2002. 456(1-3): p. 45-9.*
 110. Kwekkeboom, D., et al., *In vivo somatostatin receptor imaging in medullary thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol Metab, 1993. 76: p. 1413-1417.*
 111. Buscail, L., et al., *Loss of sst2 somatostatin receptor gene expression in human pancreatic and colorectal cancer. Cancer Res, 1996. 56: p. 1823-1827.*
 112. Kubicka, S., et al., *Hepatocellular carcinoma in Germany: a retrospective epidemiological study from a low-endemic area. Liver, 2000. 20(4): p. 312-8.*

10. Lebenslauf

Michael Schmitz
Makarenkostr. 51b, Zi. 594
17491 Greifswald
☎ 0179-524 93 93
E-Mail: schmitzm@uni-greifswald.de

Geburtsdatum/-ort	3. Juli 1976 in Köln
Staatsangehörigkeit	deutsch
1983 – 1996	Katholische Grundschule und Geschwister-Scholl-Gymnasium in Pulheim Abschluss: Abitur
1996 – 1997	Zivildienst beim Malteser-Hilfsdienst, Köln als Rettungsanwärter
Sommer 1997	Medizinstudium an der Universität Köln
Sommer 1999	Physikum Wechsel an die Universität Hamburg
Sommer 2000	1. Staatsexamen
Sommer 2001	Erasmusstipendium und Studium an der Universidad de Sevilla, Spanien
Sommer 2002	Rückkehr an die Universität Hamburg
Sommer 2003	2. Staatsexamen
Februar – Mai 2004	1. PJ-Tertial Chirurgie am Hospital Regional de Temuco, Chile
Mai – September 2004	2. PJ-Tertial Innere Medizin <ul style="list-style-type: none">- 8 Wochen Gastroenterologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf- je vier Wochen Gastroenterologie und Endokrinologie, Mount-Sinai-Hospital, Toronto, Kanada
September 2004 – Januar 2005	3. PJ-Tertial Neurologie am Kantonsspital Aarau, Schweiz
Ä April 2005	3. Staatsexamen
seit Juni 2005	Assistenzarzt in der Abteilung für Gastroenterologie, Endokrinologie und Ernährungsmedizin am Universitätsklinikum Greifswald

11. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die am Zustandekommen und Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren.

An erster Stelle danke ich Herrn PD Dr. med. Michael Bläker für die freundliche Überlassung des Themas dieser Dissertation. Ihm gilt zudem mein ganz besonderer Dank für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit

Herrn Prof. Dr. med. Andreas Gocht danke ich für fachlichen Rat, die Bereitstellung der Tumorproben und für die Möglichkeit der Nutzung der Laborräume im Institut für Pathologie.

Ein besonders großer Dank gilt Frau Sylvia Burghardt für die exzellente Einarbeitung und Anleitung während des experimentellen Teils.

Herrn Prof. Dr. med. Andreas de Weerth danke ich herzlich für die Bereitstellung des Laborarbeitsplatzes und der Geräte.

Und schließlich bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mich stets auf meinem Weg unterstützten.

12. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmitteln nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.
